

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: biologie

Studijní obor: biologie



Kateřina Kunteová

Vliv restrikčních faktorů na replikaci viru hepatitidy B

Effect of restriction factors on replication of hepatitis B virus

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Ivan Hirsch, CSc.

Praha, 2016

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně, že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

podpis autora

Děkuji svému školiteli RNDr. Ivanu Hirschovi, CSc. za vedení a za cenné rady a připomínky při zpracování této práce.

Abstrakt

Cílem práce je provedení literární rešerše vlivu buněčných restrikčních faktorů na replikaci viru hepatitidy B. Důraz bude kladen na srovnání vrozené a přirozené imunity a vlivu stejných nebo analogických restrikčních faktorů ovlivňujících replikaci virů HBV a HIV-1. Vzhledem ke klíčové roli cccDNA pro udržení HBV v lidském organismu, bude studován vliv restrikčních faktorů na možnosti její destrukce a eradikace. V práci bude rovněž zohledněn vliv restrikčních faktorů na replikaci a genovou expresi HBV při akutní, chronické a okultní infekci.

Klíčová slova

virus hepatitidy B (HBV); HIV-1; replikační cyklus; restrikční faktory; SAMHD-1; BST2/tetherin; APOBEC3A/B/G; kovalentně uzavřená kruhová DNA HBV (cccDNA); replikace a transkripce; akutní, chronická a okultní infekce HBV

Abstract

Specific aim of this bibliographic research is to elucidate the effects of cellular restriction factors on HBV replication. The work will specially analyze the role of the innate and natural immunity and to compare the effect of analogical or identical restriction factors on HBV and HIV-1 replication. Because of the central role of cccDNA for virus persistence in human organism, the work will study the effects of restriction factors on its possible destruction and eradication and a possible HBV cure. The research will also be focused on the effect of restriction factors during acute, chronic and occult infection.

Keywords

hepatitis B virus (HBV); HIV-1; replication cycle; restriction factors; SAMHD-1; BST2/tetherin; APOBEC3A/B/G; covalently closed circular HBV DNA (cccDNA); replication and transcription; acute, chronic and occult infection with HBV

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Nespecifická imunita	2
2.1	PRRs	3
2.2	Interferony	4
3	Replikační cyklus viru hepatitidy B.....	6
4	Restrikční faktory a jejich interakce s viry	10
4.1	Smc	10
4.2	SAMHD1	11
4.3	Struktura SAMHD1	11
4.3.1	Vliv SAMHD1 na virovou replikaci	13
4.4	RIG-I.....	14
4.5	APOBEC	15
4.5.1	Struktura A3	16
4.5.2	Vliv APOBEC3 na virovou replikaci.....	16
4.6	BST2.....	20
4.6.1	Struktura BST2.....	20
4.6.2	Vliv BST2 na virovou replikaci	21
5	Závěr	24
6	Seznam použité literatury.....	26

Seznam zkratek

A3G	Apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme, Catalytic polypeptide-like 3G	apolipoprotein B mRNA upravující enzym, katalytický polypeptid podobný 3G
AID	Activation-Induced cytidine Deaminase	aktivací indukovaná deamináza
AP sites	Apurinic/apyrimidinic sites	apurinová/apyrimidinová místa
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme, Catalytic polypeptide	apolipoprotein B mRNA upravující enzym
BST2	Bone marrow Stromal Cell antigen 2	buněčný antigen kostní dřeně
cccDNA	Covalently Closed Circular DNA	kovalentně do kruhu uzavřená DNA
CD8+	Cluster of Differentiation 8 T-lymphocytes	CD8+ lymfocyty
DNA	Deoxyribonucleic Acid	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	Deoxyribonucleotide Triphosphates	deoxynukleotid trifostáty
GPI	Glycosylphosphatidylinositol	glykosilfosfatidilinositol
HBV	Hepatitis B Virus	virus hepatitidy B
HCC	Hepatocellular Carcinoma	hepatocelulární karcinom
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus - type 1	virus lidské imunitní nedostatečnosti – typ 1
IFN	Interferon	interferon
IFNAR	Interferon- α/β Receptor	receptor pro interferon α/β
IFNGR	Interferon- γ Receptor	receptor pro interferon γ
IFNLR	Interferon- λ Receptor	receptor pro interferon λ
IL	Interleukin	interleukiny
IRF	Interferon Regulatory Factor	interferony regulované faktory
ISG	Interferon Stimulated Genes	interferony stimulované geny
MVBs	Multivesicular Bodies	multivesikulární tělíska
NF- κB	Nuclear Factor- κ B	jaderný faktor- κ B
NTCP	Na ⁺ -Taurocholate Cotransporting Polypeptide	sodík-taurocholát kotransportující polypeptid
NTPs	Nucleotide Triphosphates	nukleotid trifostáty
OBI	Occult Hepatitis B Virus Infection	okultní infekce hepatitidy B

PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns	struktury typické buňky patogenů
pgRNA	Pre-genomic RNA	pregenomová RNA
PHHs	Primary Human Hepatocytes	primární lidské hepatocyty
PRRs	Pathogen Recognition Receptors	receptory rozpoznávající patogeny
RIG-1	Retinoic Acid-Inducible Gene 1	kyselinu retinovou indukovatelný gen 1
RNA	Ribonucleic Acid	ribonukleová kyselina
SAMHD1	Sterile Alpha Motif and Histidine-aspartic Domain containing protein 1	protein obsahující sterilní alfa motiv a histidin-asparagovou doménu
SIV	Simian Immunodeficiency Virus	virus opičího imunodeficitu
Smc	Structural Maintenance of Chromosomes	strukturální údržba chromosomů
TLRs	Toll-like Receptors	receptory podobné genu Toll
TNF	Tumor Necrosis Factor	faktor nádorové nekrózy

1 Úvod

Imunita hraje významnou roli při kontrole virových infekcí. Jako celek je to složitý a komplexně propojený systém orgánů, tkání, jednotlivých buněk, jejich receptorů a signalizačních molekul. Hlavním účelem imunitního systému každého organismu je nepřetržitá obrana těla před patogeny jak zvenčí, tak zevnitř organismu. Imunitní systém musí umět rozeznávat tělu vlastní buňky, vůči kterým je tolerantní, ale zároveň má schopnost odlišit staré, poškozené nebo mutované buňky a odstranit je. Pokud se zaměříme pouze na imunitní systém savců, můžeme rozlišit dvě základní složky, a to imunitu přirozenou a adaptivní, obě mají poněkud odlišné mechanismy působení, ale jsou spolu velmi úzce provázané a jejich souhra slouží k co nejlepší obraně organismu. Bez správně fungující přirozené imunity je pro napadený organismus téměř nemožné začít se vůči patogenu bránit, protože bez první linie obrany nemohou fungovat ani navazující složky. A ačkoli je přirozená imunita jeden z vůbec nejdůležitějších mechanismů pro přežití, mnoho součástí a funkcí celého systému zůstává vědou stále neobjasněno. V posledních letech s vývojem nových metod a analyzačních technik se výzkum neustále rozvíjí a byla zveřejněna celá řada výzkumných prací, které studují interakci virů a imunitní systému hostitele.

Jednou z nejdynamičtěji se rozvíjejících složek výzkumu přirozené imunity jsou buněčné restrikční faktory, které hrají v obraně proti virům velmi zásadní roli. Cílem této práce je ukázat význam některých restrikčních faktorů pro hostitelský organismus a jejich vliv na replikaci viru HBV (virus hepatitidy B). Replikační strategie HBV se v určitých krocích shoduje s replikační strategií viru HIV-1 (virus lidské imunitní nedostatečnosti – typ 1), proto se nabízí srovnání významu působení stejných molekulárních mechanismů na rozdílné typy virů.

Každý z těchto virů sice náleží do jiné skupiny, HIV-1 do čeledi Retroviridae a HBV do čeledi Hepadnaviridae. Oba spojuje mechanismus reverzní transkripce a některé další mechanismy replikace, které mohou být úspěšně cíleny restrikčními faktory. HIV-1 přepisuje svůj RNA genom pomocí reverzní transkripce do DNA podoby, kterou pak zabudovává do genomu hostitele. HBV má sice genom ve formě DNA, ale část jeho replikačního cyklu reverzní transkripci také zahrnuje. Podstatným rozdílem je, že retrotranskripce u HIV probíhá v časně fázi virového cyklu před započítím transkripce virového genomu. Kdežto u HBV dochází k retrotranskripci v pozdní fázi na základě transkribované pregenomové RNA. Oba viry mají virový obal odvozený z membrán hostitelských buněk, který získávají, když virové potomstvo

opouští infikovanou buňku. Ačkoli při infekci HBV ve většině případů nakažených osob dojde ke spontánnímu vyléčení, stále zbývá určité procento infikovaných, u nichž žloutenka přejde do chronického stádia, což vyústí v cirhózu jater nebo jaterní karcinom. Celosvětově je 36,9 milionů lidí infikovaných virem HIV a 240 milionů lidí s chronickou hepatitidou B, tato čísla svědčí o důležitosti zkoumání možných látek, které by byly schopny tato závažná lidská onemocnění zastavit.

2 Vrozená imunita

V anglickém textu označována jako innate immunity. V evoluci byla vyvinuta dříve než imunita adaptivní a právě proto se vyskytuje u většiny organismů, na rozdíl od adaptivní imunity, kterou nalezneme pouze u obratlovců. Pro to, aby složky nespecifické imunity mohly zahájit reakci proti cizorodé částici, nebo poškozené buňce nepotřebují předchozí zkušenost s daným agens. Mechanismy vrozené imunity jsou kódované v genomu, fungují okamžitě, během několika hodin od rozpoznání patogenu. Pokud však patogen není rozpoznán právě pomocí vrozené imunity, nemůže nastat ani cytotoxická ani protilátková odpověď zprostředkovaná imunitou adaptivní.

Patogeny jsou rozpoznávány podle specifických, fylogeneticky konzervovaných struktur, které se běžně v mnohobuněčných organismech nevyskytují a pro mikroorganismy jsou důležité především pro jejich přežití, nazývají se Pathogen-Associated Molecular Patterns - PAMPs (molekulární vzory typické buňky patogenů). Mezi tyto molekuly řadíme například cizorodé nukleové kyseliny, polysacharidy, lipoproteiny, flagelin, glykolipidy a další. Tyto struktury jsou rozeznávány vždy, aniž by záleželo na tom, zda pochází z živého nebo mrtvého mikroorganismu, nebo jestli se mikroorganismus právě replikuje či nikoliv. Pro různé PAMPs mají buňky specifické receptory PRR (Pathogen Recognition Receptor), které jsou konstitutivně exprimovány, jsou druhově specifické a zajišťují konkrétní obrannou reakci proti danému PAMP (shrnutí v Bertoletti and Ferrari, 2011; Iwasaki and Medzhitov, 2015). Přes signalizaci těmito receptory je následně zahájena interferonová a zánětlivá reakce proti patogenům, především prostřednictvím chemokinů a cytokinů. PRRs rozpoznávající virové infekce jsou různých typů: receptory pro cytosolickou DNA, Toll-like receptory (TLR), RIG-I-like receptory (RLR) rozeznávající virovou RNA, receptory rozpoznávající lektiny typu C (CLR), a NOD-like receptory rozeznávající mikrobiální struktury a také molekuly značící buněčnou smrt nebo poškození buňky (Kumar et al., 2011).

První linie unikátní sebeobrany buněk, zaměřené zejména proti virům, hlavním nitrobuněčným parazitům probíhá přímo v infikovaných buňkách. Zde hraje důležitou roli rozdělení vnitřního buněčného prostoru. Proto, aby se mohl virus replikovat v jádře, musí překonat mnoho bariér a překážek, které dohromady tvoří ucelený systém obrany samotné buňky (Randow et al., 2013). Tyto vnitřní protivirové mechanismy rozeznávají specifické virové komponenty a blokují replikaci a sestavení virové částice rovnou uvnitř buňky, na rozdíl od PRRs, které inhibují virovou infekci nepřímo, expresí protivirových proteinů. Funkci této vnitřní, přirozené obrany (v angličtině označované jako intrinsic immunity) zastávají, právě restrikční faktory. Specifické restrikční faktory se vyskytují v určitých buněčných typech a jsou přizpůsobené na konkrétní skupiny virů (shrnutí v Yan and Chen, 2012). Pro neadaptovaný virus by bylo velmi složité některou z překážek obejít a účinně tak dokončit svůj replikační cyklus, ale dlouhodobým soužitím virů a hostitele se v evoluci vyvinuly virové proteiny, které mají na restrikční faktory inhibiční efekt a naopak restrikční faktory inhibující virovou replikaci. V dalších částech práce bude shrnuto jaké restrikční faktory a za jakých podmínek inhibují replikaci HBV a HIV.

Jako hlavní činitele přirozené imunity zprostředkované specializovanými buňkami imunitního systému můžeme označit buňky vzniklé z myeloidní linie tedy makrofágy a dendritické buňky, dále také natural killer buňky vzniklé lymfoidní cestou. Ty všechny tvoří buněčnou složku aktivovanou v případě, že sebeobrana virem infikovaných buněk selže. Humorální složku nespecifické imunity tvoří hlavně komplement, interferony a laktiny.

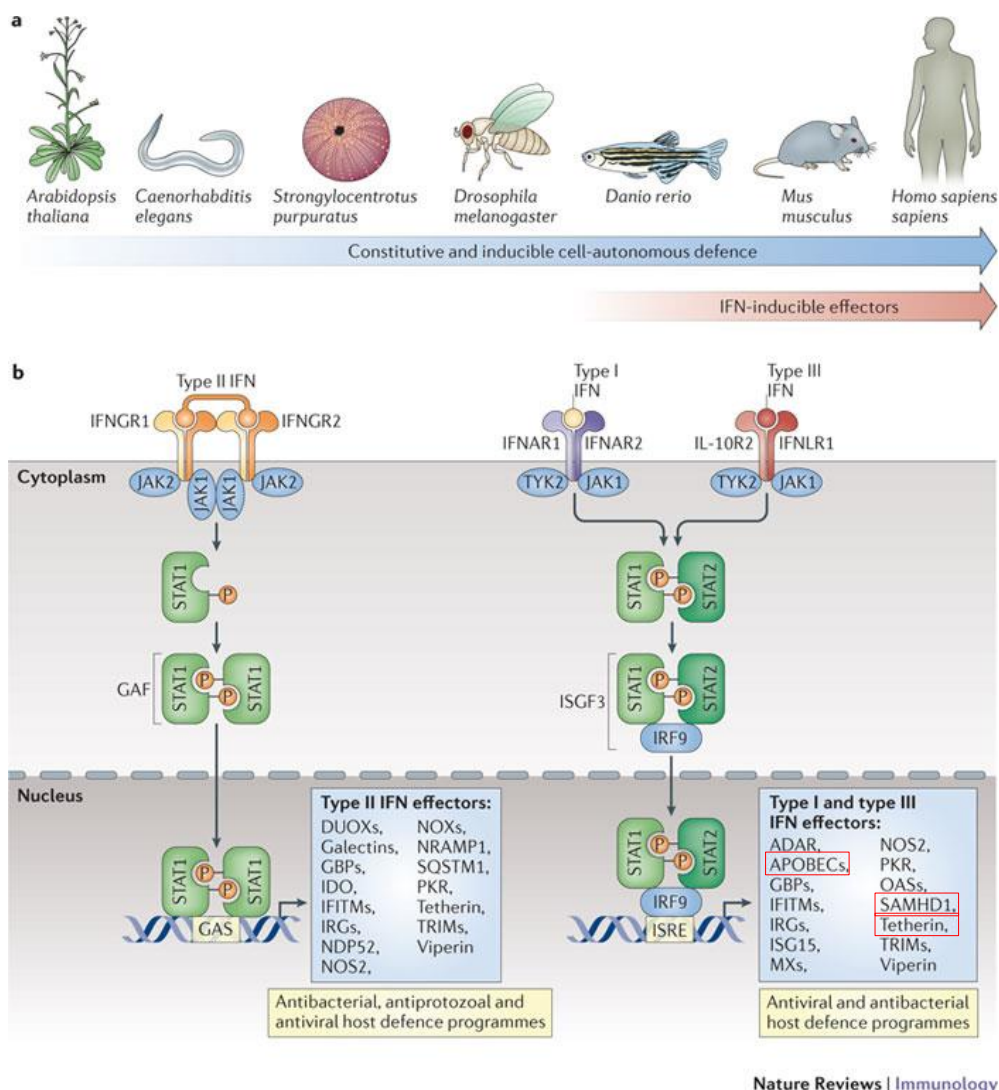
2.1 PRRs

K tomu aby byl HBV eradikován a nedocházelo k perzistenci infekce, je zapotřebí především aktivace adaptivní imunity. Dlouhou dobu převládal názor, že virus dokáže imunitní systém obejít tím, že je v brzkých fázích infekce pro receptory přirozené imunity v podstatě neviditelný. Za tento stav je zodpovědný způsob virové replikace, kdy se genom replikuje v uzavřených virových nukleokapsidách a jeho polyadenylované a čepičkou opatřené mRNA nepůsobí aktivaci interferonů přes TLRs (Wieland et al., 2004). A až po několika týdnech infekce vstupují do jater CD8⁺ T-lymfocyty, které rozpoznají antigeny HBV, zahájí útok proti nakaženým buňkám a dále indukují necytopatickou interferonovou odpověď (Thimme et al., 2003). To, že jsou složky adaptivní imunity nezbytné pro vymýcení viru, je všeobecně přijímáno, co se ale změnilo, je názor na roli přirozené imunity během infekce HBV. Zdá se, že už v brzkých fázích infekce HBV aktivuje některé PRRs přímo v hepatocytech. Jejich PAMPs, kterými jsou virové nukleové kyseliny, interagují s TLRs a RIG-I a tím aktivují produkci

interferonů a prozánětlivých cytokinů. Každý z TLR 1-10 rozpoznává různé PAMPs pomocí svých ektodomén. Pro virové infekce jsou nejdůležitější v endosomech exprimované TLR 3, 7, 8 a 9. TLR 7 a TLR8 rozpoznává virové RNA a homology nukleových kyselin virů. TLR 9 má schopnost rozeznávat dvouřetězcovou virovou DNA a CpG oligonukleotidy nemetylovaných virových DNA, TLR3 rozpoznává dvouřetězcovou RNA. Uvedené receptory spouští dráhu, která vede k produkci interferonu typu I (alfa a beta (IFN- α/β)) a III (lambda (IFN- λ)) (shrnutí v Kawai and Akira, 2006).

2.2 Interferony

Jsou to rozpustné proteiny, které se řadí mezi cytokiny. Spolu s dalšími proteiny jako jsou například TNF (tumor necrosis factor) a IL (interleukiny) vytváří důležitou komponentu nespecifické imunity. Právě interferony jsou velmi významné a účinné proti infekcím vyvolaných viry (Der et al., 1998). Interferony aktivují buňky imunitního systému a indukují v buňce produkci vlastních antivirových restrikčních faktorů, což je výsledek kaskády reakcí, která vede ke stimulaci exprese interferon stimulovaných genů (ISG). Také informují okolní nenakažené buňky o blížícím se nebezpečí a aktivují v nich obranné mechanismy. Okolní buňky jsou informované o blížící se virové infekci přes produkovaný IFN β , který přichází od napadené buňky, tento signál následně v nenakažených buňkách stimuluje produkci IFN α (shrnutí v Tomasello et al., 2014). Ke stimulaci požadovaných genů, které brání virové replikaci v jejích různých fázích, dochází po vazbě interferonu na příslušný receptor a závisí tedy na typu interferonové odpovědi (Obrázek 1).



Obrázek 1 (A) Vývoj autonomní buněčné imunity a vznik interferony indukovaných mechanismů (IFN) v době kolem cca před 530 miliony let. (B) Buněčné obranné proteiny jsou indukovány interferony (IFN) přes tři typy receptorů. První receptor je tetramer - složený ze dvou IFN γ receptorových dimerů, a to dvou řetězců IFNGR1 a dvou řetězců IFNGR2. Je receptorem pro IFN typu II. Druhý receptor je heterodimer z IFN α/β receptoru 1 (IFNAR1 a IFNAR2), a je to receptor pro interferonovou odpověď typu I. Poslední receptor je komplex IL 10 receptoru 2 asociovaným s receptorem pro IFN λ (IFNLR1), který je receptorem pro interferon typu III. Převzato z (MacMicking, 2012)

Ty rozdělujeme podle jejich receptorů do třech tříd: IFN typu I (IFN α/β), IFN typu II (IFN γ) a nejpozději objevené IFN typu III (IFN λ). U všech typů interferonů existují určité odlišnosti, které je vymezují, ale u IFN typu I a III lze najít i mnoho shodných znaků. Tím je především spuštění shodné signální kaskády, která vede k produkci stejných efektorových genů, byť je aktivována přes odlišné receptory. Heterodimer z IFN α/β receptoru 1 (IFNAR1 a IFNAR2) je receptor pro interferonovou odpověď typu I. Komplex interleukin-10 (2IL-10R2) asociovaný s IFN λ receptor 1 (IFNLR1) je receptorem pro IFN typu III (shrnutí v Durbin et al., 2013; MacMicking, 2012). Liší se také umístění daných receptorů a produkce interferonů v závislosti

na konkrétních buněčných typech. Receptory pro IFN β/α jsou na všech jaderných buňkách a ani jejich produkce není omezená na konkrétní buněčný typ. Receptory pro IFN γ (IFNGR) mají také téměř všechny jaderné buňky, ale jejich exprese jsou schopné zajistit pouze bílé krvinky, a to především NK buňky a T-lymfocyty, produkce IFN λ by také byla možná ve všech jaderných buňkách, ale receptor mají pouze buňky epitelální. IFN λ se tedy také jako IFN β/α nachází v trámčitém epitelu jater, a proto hraje významnou roli v obraně proti HBV (shrnutí v Lin and Young, 2014). Pro účely práce je vhodné zaměřit se spíše na IFN typu I a III, které jsou pro infekci HBV podstatnější.

Oba typy interferonu, jak IFN I tak typ IFN III jsou stimulovány přes PRR jako jsou například TLR nebo RLR. Výsledkem dráhy snímající virové produkty je aktivace interferony regulovaných faktorů 3 a 7 (IRF 3, IRF 7). Oba slouží jako hlavní transkripční faktory pro ISG (shrnutí v Honda and Taniguchi, 2006).

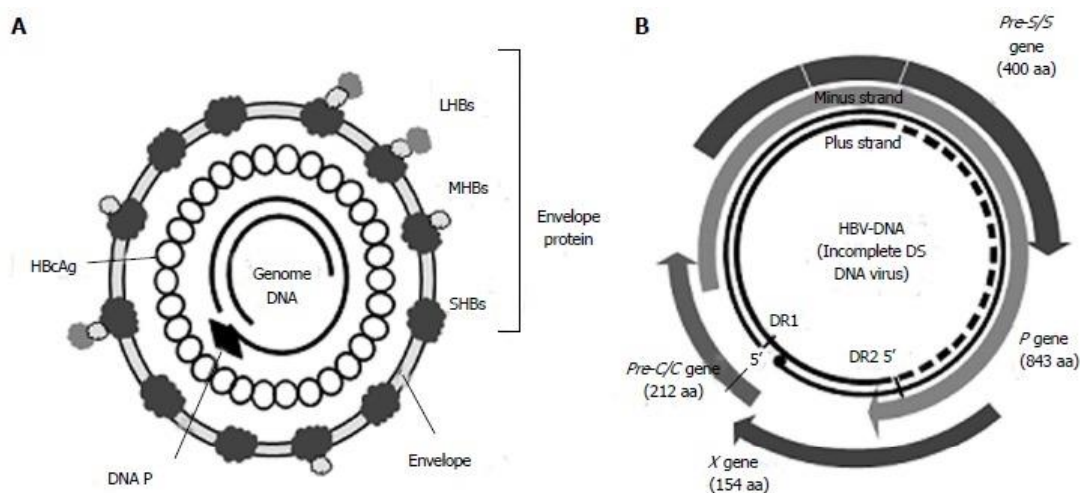
3 Replikační cyklus viru hepatitidy B

Virus hepatitidy B byl objeven v roce 1966, patří do rodiny Hepadnaviridae, rod Orthohepadnavirus (rod infikující savce) a spolu s hepatitidou C (řazená do rodiny Flaviviridae) jsou jedny z nejčastějších a také nejzávažnějších příčin onemocnění jater u lidí (Choo et al., 1989). Hepatitida B způsobuje jak akutní infekci, tak i chronické onemocnění končící jaterní cirhózou nebo hepatocelulárním karcinomem (HCC). Virus sám o sobě cytopatický není, poškození jater je zapříčiněno imunitní reakcí cytotoxických T-lymfocytů. Zásah imunitního systému proti HBV se liší u každého jednotlivce, tím je i dána variabilita průběhu onemocnění. Odlišnost projevů závisí také na tom, jak účinné je omezení virové replikace právě díky restričním faktorům (Zhang and Hu, 2015).

Přenos viru je uskutečňován kontaktem infikovaných tělních tekutin, možný je také přenos viru z matky na dítě, buď již v průběhu těhotenství anebo při porodu (Hsu et al., 1993). Pokud je člověk nakažen v dětském věku, je riziko perzistence infekce mnohem vyšší než při nákaze v dospělosti, u více než 90% novorozenců nakažených HBV se vyvine chronická hepatitida, kdežto pouze u 5% dospělých dojde nemoc do chronického stadia (Fattovich et al., 2008). Ke zjištění infekce hepatitidou B se většinou využívá sérologického stanovení povrchového antigenu viru (HBsAg), který bývá v krvi zjištělný v rozmezí 1-9 týdnů po infekci. Pokud v séru přetrvává déle, jak 6 měsíců naznačuje to přechod infekce do chronického stavu (Lavanchy, 2004). S pozdějšími komplikacemi jako je jaterní cirhóza nebo hepatocelulární

karcinom při chronické infekci HBV, bývají také spojovány zvýšené hladiny povrchového antigenu (HBsAg) a virové DNA v krevním séru. Díky tomu tak lze odhadnout riziko cirhózy jater a HCC u chronicky nemocných pacientů a přizpůsobit tomu léčbu (Lee et al., 2013). Naopak velmi nízkou nebo žádnou přítomnost HBsAg v séru spolu s přítomností virové DNA v játrech nalézáme při okultní fázi infekce (OBI occult hepatitis B virus infection). Při tomto stavu je v játrech přítomna cccDNA, ale je silně potlačovaná virová replikace a genová exprese. Okultní fáze pravděpodobně v dlouhodobějším hledisku může vést k postižení jater hepatocelulárním karcinomem. Také hrozí nebezpečí znovu propuknutí infekce při imunosupresi jedince, který je nosičem okultní hepatitidy (shrnuje Said, 2011).

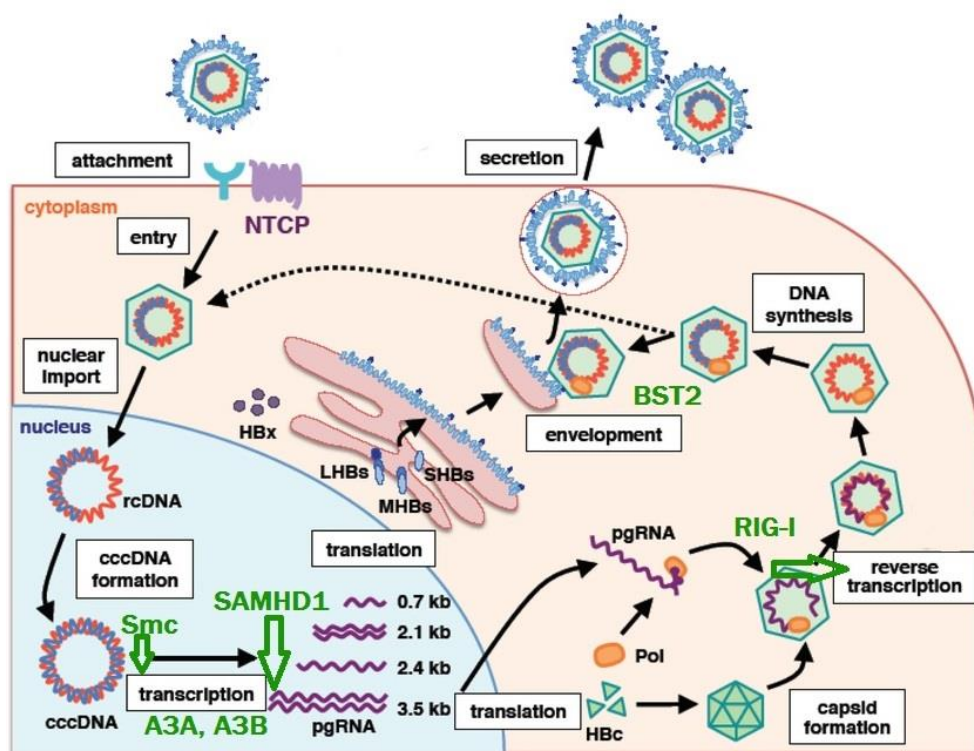
Genom zástupců skupiny Hepadnaviridae je poměrně malý, cca 3-3,3 kbp a od ostatních virů se liší především svojí replikační strategií, ve které je zahrnuta reverzní transkripce. HBV má genom o velikosti 3200 nukleotidů a představuje ho relaxovaná cirkulární, částečně dvouvláknová DNA, kdy jeden řetězec je kompletní (mínus řetězec) a na 5'konci je kovalentně připojen k virové reverzní transkriptáze. Druhý řetězec je nekompletní a na svém 5'konci má připojený RNA oligomer odvozený od 5'konce pgRNA, který slouží jako primer pro syntézu plus vlákna. Celý virion má v průměru 30-42 nm, nukleovou kyselinu s virovou reverzní transkriptázou obaluje proteinové ikosahedrální kapsidové core, a dále lipidové pouzdro s proteiny nutnými pro rozpoznání a vstup do hostitelských buněk (Obrázek 2). HBV se nyní rozlišuje mezi 8 genotypů – A-H, které se liší počtem nukleotidů a delecemi v různých oblastech genomu (Kao and Chen, 2006). Bylo také prokázáno, že různé geonotypy se vyskytují v jiných geografických oblastech světa (Kao, 2002) a je také možné, že pacienti s odlišným virovým genotypem budou mít různý průběh onemocnění a budou jinak reagovat na léčbu (Orito et al., 2001).



Obrázek 2 Struktura virové částice a schematický diagram genomu. A) Genom je obalen kapsidovým proteinem, který vytváří ikosaedrální strukturu kapsidy. Ta je dále obalena hostitelskou membránou a virovými malými glykoproteiny (S), středními (M) a velkými (L) = kompletní virová částice. B) Virový genom. Převzato z (Yano et al., 2015)

Z krevního řečiště se virus dostává k hepatocytům, dochází k rozpoznání cílových buněk a virion pak interaguje s heparansulfátovými proteoglykany na povrchu hepatocytu. Poté se virus přichytí pomocí N-koncové pre-S1 domény L-proteinu (velký povrchový glykoprotein s antigenem HBsAg), která je zodpovědná za tkáňovou specifitu, a také pomocí antigenní smyčky (AGL-antigenic loop) S-proteinu (malý obalový glykoprotein s antigenem HBsAg) (Sureau and Salisse, 2013). Virus se potom s vysokou afinitou naváže na receptor NTCP, sodíkový-taurocholát kotransportující polypeptid, což je membránový protein specifický pouze pro hepatocytární tkáň (Ni et al., 2014). Po vniknutí viru do buňky dochází v cytoplazmě hepatocytu k rozbalení lipidového pouzdra a následnému transportu nukleokapsidy do jádra. V jádře začne oprava jednořetězcových úseků virové DNA pomocí virových a hostitelských enzymů a vzniká ccc DNA forma, která slouží jako předloha pro syntézu veškerých RNA a celkové replikace, prostřednictvím hostitelské polymerázy II. Transkripce běží ze čtyř promotorů a kódované oblasti se překrývají. Jsou to oblasti pro geny S – surface, obalové, C – core, kapsidové, X – pro X gen a P pro polymerázu (Obrázek 2) (Lau and Wright, 1993). Vznikají kratší sub-genomové RNA a pre-genomová RNA, která je delší než celý genom. Sub-genomové RNA slouží jako mRNA pro syntézu virových proteinů na endoplasmatickém retikulu (nukleokapsidové proteiny – HBcAg; HBeAg; malý obalový S protein HBsAg, střední M-HBsAg a velký L-HBsAg); nestrukturní proteiny – Pol a HBx). Pre-genomová RNA a polymeráza jsou enkapsidovány do nových nukleokapsid, tvořených HBcAg, kde následně dochází k reverzní transkripci pre-genomové RNA do minus vlákna DNA a pre-genomová RNA je degradována pomocí RNázy H. V počátečních fázích infekce jsou zralé nukleokapsidy

přesouvány zpět do jádra, aby se amplifikovala cccDNA, zvýšil se počet virových transkriptů a translačních produktů. V pozdějších fázích pak následuje maturace a exocytosa virionů zprostředkovaná buněčnými multivesikulárními tělisky (MVBs). Při pučení virového potomstva nedochází k poškození hostitelské buňky (shrnutí v Seeger and Mason, 2000).



Obrázek 3 Replikační cyklus viru hepatitidy B a jeho ovlivnění restričními faktory. Převzato a přepracováno z (Watashi et al., 2014)

V krvi se pak u nakažených jedinců objevují tzv. Daneovy partikule, což jsou právě kompletní infekční 42 nm viriony s vnitřním HBcAg antigenem, dále neinfekční struktury s povrchovým antigenem HBsAg, subvirové HBsAg částice pučící z endoplasmatického retikula (Lee, 1997).

Imunitní odpověď na infekci HBV má poměrně značné zpoždění, v prvních týdnech nedetekujeme v infikovaných hepatocytech žádnou expresi genů spojených s imunitní odpovědí, k aktivaci imunitního systému dochází až v exponenciální fázi replikace viru. (Wieland et al., 2004). Pravděpodobně právě strategie viru způsobuje zpoždění imunitních reakcí, protože replikace probíhá v uzavřených nukleokapsidách a vše je imunitním mechanismům skryté (Samuel, 2001). Jak bylo zmíněno dříve, HBV hepatocyty nezabíjí, ale patogeneze onemocnění je následkem reakce imunitního systému, takže odstranění viru silnou imunitní reakcí, je spojené s akutním zánětlivou reakcí buněk jater. Při silné imunitní reakci je velká šance, že dojde k eliminaci viru z těla, ale s tím také souvisí fakt, že bude poškozena

jaterní tkáň. S příliš silnou imunitní reakcí souvisí projev akutní fulminantní hepatitidy, která souvisí s vysokou mortalitou. Je-li imunitní reakce příliš slabá, infikovaný jedinec nemá akutní příznak eradikace spojené s bojem s infekcí, často nastává u těchto případů perzistující infekce. Ta je nebezpečná kvůli nevědomému přenosu viru a také hrozbě pozdějších komplikací jako je cirhóza nebo HCC. U většiny dospělých pacientů dojde k vývoji adekvátní imunitní odpovědi, vymýcení viru a vytvoření se protilátek proti opětovnému návratu infekce. Na tomto ději se podílí jak přirozený i adaptivní imunitní systém, buněčná i protilátková imunita.

4 Restrikční faktory a jejich interakce s virem

Jak již bylo v předchozí části práce zmíněno, restrikční faktory jsou součástí vnitřní imunity. Kvůli neustálému tlaku patogenů se v průběhu evoluce vyvinul silný imunitní systém, jehož součástí jsou také některé buněčné restrikční faktory, které budou stát v první linii při obraně hostitele. Jejich úkolem je blokovat replikaci a složení virové partikule už v přímo v nakažené buňce. Jsou to substance, které přímo a efektivně snižují virovou infekčnost. Na rozdíl od ostatních hostitelských proteinů, které brání replikaci viru, se nenachází v tak hojném počtu, ale i přesto jsou pro virovou replikaci velkým nebezpečím. Z toho důvodu si proti nim mnohé viry vytvořily v průběhu evoluce silnou antagonistující odpověď, která - bohužel pro hostitelské buňky - brání restrikčním faktorům projevit se v plném rozsahu (Ballana and Esté, 2015).

4.1 Smc

Proteinové komplexy Structural maintenance of chromosomes (Smc) jsou velké polypeptidy tvořící dimerní strukturu tvaru písmene V. Vyskytují se ve všech eukaryotických organismech a slouží k manipulaci s DNA. Podílí se na segregaci chromosomů během mitózy i meiózy, na jejich opravách, transkripci a replikaci (shrnutí v Hirano, 2006). Ale až do nedávna nebyly jeho účinky spojovány s antivirovou aktivitou. S překvapivými výsledky přišla studie Decorsière et al.,(2016) ve které bylo uveřejněno, že komplex Smc5/6 má přímé antivirové účinky na replikaci HBV (Obrázek 3). Na rozdíl od ostatních restrikčních faktorů však Smc není ISG. Ačkoliv má Smc5/6 antivirovou aktivitu, tak jako u dalších restrikčních faktorů jsou jeho účinky antagonistovány virovým proteinem. V případě infekce HBV se jedná o HBx protein, který stimuluje transkripci genomu HBV. Dřívější studie prokázaly, že pro virovou infekci je vazba HBx k DDB1 (DNA-damage-binding protein 1), podjednotku E3 ubiquitin ligázy, důležitá k tomu, aby zajistil degradaci neznámého hostitelského proteinu (Li et al., 2010). Decorsière et al.,(2016) určili, že cílem který HBx určuje k likvidaci v proteasomu je

mezi několika dalšími kandidáty právě komplex Smc5/6. Při infekci buněčné kultury HBV s defektním HBx proteinem nedocházelo k transkripci virových genů ani poklesu množství Smc5/6, naproti tomu při infekci kultury divokým HBV zřetelně pokleslo množství Smc5/6. Antivirová aktivita Smc tedy spočívá v tom, že v nepřítomnosti HBx váže virový DNA genom (nebo podle jejich pokusů kteroukoli episomální DNA) a znemožňuje jeho transkripci. Tím byla ukázána nová, nikdy předtím nepopsaná role Smc, jakožto antivirového restričního faktoru (Decorsière et al., 2016).

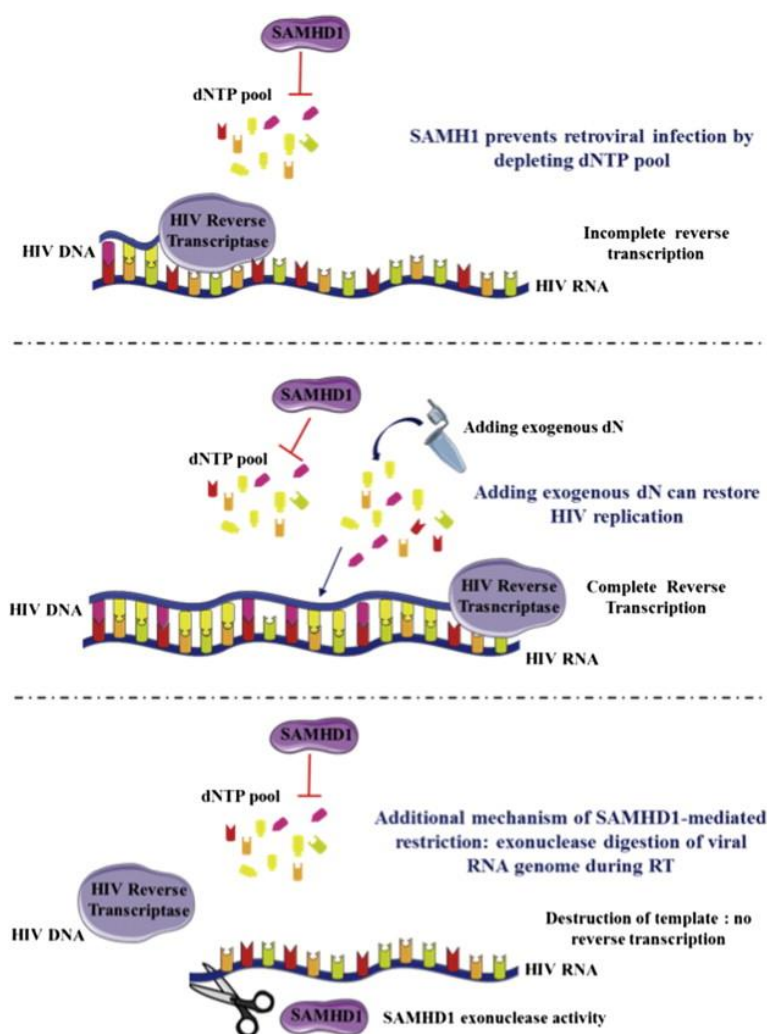
4.2 SAMHD1

Celým názvem Sterile alpha motif and histidine-aspartic domain containing protein 1. Buněčný enzym, lokalizovaný především v jádře, s fosfohydrolázovou aktivitou, který štěpí deoxynukleotid trifostáty (dNTPs) na anorganický trifosát a deoxynukleotid (dNA). Odstraňuje tak dNTPs, které by byly využity polymerázou pro syntézu nového vlákna DNA. Na rozdíl od dNTPs nejsou štěpeny nukleotid trifostáty (NTPs). Důvodem je fakt, že právě NTPs jsou základním zdrojem energie pro buňku (Goldstone et al., 2011). Tato aktivita byla nejprve zaznamenána u bakterií (Kondo et al., 2004), později u savčích a lidských buněk, zásadním poznatkem o existenci tohoto enzymu je fakt, že tvoří důležitou složku v obraně infikovaných buněk HIV-1. Bylo prokázáno, že SAMHD1 je antivirový protein exprimovaný v dendritických buňkách a buňkách myeloidní linie a je stimulovaný interferony (Obrázek 1) (Goldstone et al., 2011; Laguette et al., 2011). Od ostatních restričních faktorů se svým účinkem liší, necílí přímo na virové produkty, ale replikaci ovlivňuje prostřednictvím složek hostitelských buněk. Aktivita SAMHD1 závisí na stavu buněčného cyklu. Zbytek threoninu 592 (T592) na SAMHD1 je fosforylován ve všech dělících se buňkách. Tato modifikace brání jeho antivirové aktivitě, avšak neovlivňuje další funkce enzymu. Při virové infekci, v nedělících se buňkách, dojde k odstranění fosforylace na zbytku T592 a tím se odblokuje antivirová aktivita (White et al., 2013a). Podle White et al.(2013) existují varianty SAMHD1, které nemají schopnost blokovat retrovirovou replikaci, ale stále vykazují schopnost snižovat hladiny dNTPs. Je tedy možné, že enzymatická fosfohydrolázová aktivita SAMHD1 není nezbytná pro retrovirovou restrikci.

4.3 Struktura SAMHD1

SAMHD1 tvoří dvě hlavní domény, SAM (the sterile alpha motif domain) a HD (histidine-aspartic) doména. N- koncová SAM doména má nejspíše pouze regulační funkci enzymatické

aktivity a pro virovou inhibici je SAM doména postradatelná, naopak samotná HD doména se zdá být účinnou jednotkou fungující při inhibici virové replikace (White et al., 2013b). Dokonce je jako samotná jednotka mnohem účinnější než SAMHD1 v kompletním složení. HD doména má dNTP fosforylázovou aktivitu, stimulovanou prostřednictvím kofaktoru - dGTP, ale vykazuje i nukleázovou aktivitu vůči ssDNA, ssRNA a také RNA/DNA hybridům. Obě domény navíc přispívají k vazbě nukleových kyselin (Beloglazova et al., 2013). Fosforylázovou aktivitu vykazuje enzym jak v monomerní, tak dimerní formaci, nejvyšší aktivita enzymu byla pozorována při tetramerní struktuře enzymu. Ta se vytvoří vazbou dGTP do alosterického místa, což umožní také změnu v aktivním místě potřebnou pro maximální aktivitu enzymu (Zhu et al., 2013).



Obrázek 4 (A) Model antivirové aktivity SAMHD1 – a tím je vyčerpání dNTP. Takže virové genomy nemohou dokončit reverzní transkripci. (B) přidáním dávky dNTPs se doplní jejich množství, což viru umožní dokončit reverzní transkripci. (C) další mechanismus antivirového účinku SAMHD1 může zahrnovat jeho exonukleázovou aktivitu. SAMHD1 může cílit přímo na RNA genom při reverzní transkripci a degradovat ho; degradace RNA templátu také zabráňuje reverzní transkripci a blokuje retrovirovou infekce. Převzato z (Sze et al., 2013).

4.3.1 Vliv SAMHD1 na virovou replikaci

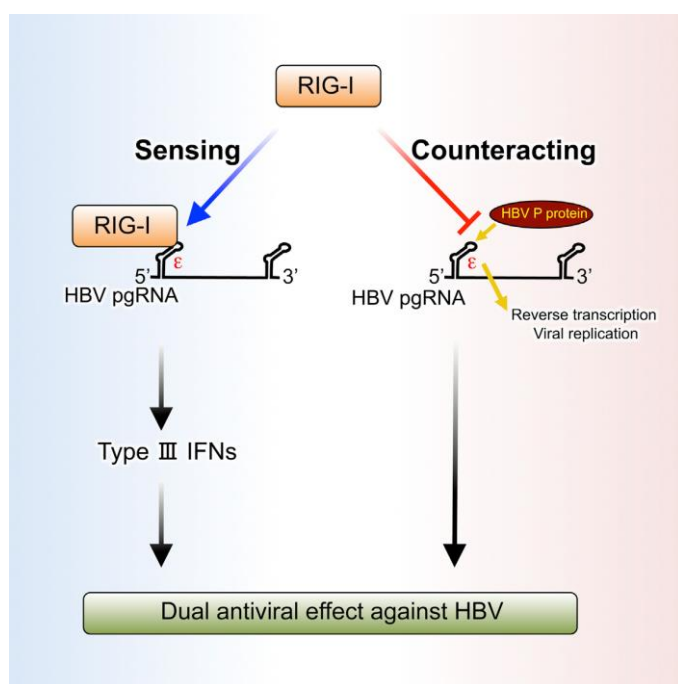
To, že SAMHD1 kromě viru HIV-1 inhibuje například replikaci několika retrovirů Feline immunodeficiency virus, Friend murine leukemia virus, bylo potvrzeno. Jeho inhibiční efekt se ale v případě ne-retro RNA virů (Seandai virus, Vesicular stomatitis virus, reovirus) nepodařilo prokázat. Z neznámého důvodu SAMHD1 preferuje pro štěpení retrovirovou RNA než RNA retrovirům podobných virů (Choi et al., 2015). Zřejmě pouze jediná studie Chen et al.,(2014) se zabývá vlivem SAMHD1 na replikaci HBV. Na inhibici viru HIV-1 pomocí SAMHD1 bylo nejdříve nahlíženo jako na účinek fosforylázové aktivity a tedy zajištění inhibice HIV-1 snižováním hladiny dNTP v buňce (Obrázek 4). Podle současných studií nezávisí schopnost inhibice HIV-1 pouze na této aktivitě enzymu. Hydrolýza dNTP totiž probíhá i v neinfikovaných dělicích se buňkách, ve kterých je SAMHD1 fosforylován a nemá antivirovou aktivitu. Další možností je inhibice replikace HIV-1 přes nukleázovou aktivitu SAMHD1. Enzym pro tuto aktivitu vyžaduje Mg^{2+} jako kofaktor, jako substrát preferenčně vybírá a štěpí jednořetězcovou RNA, DNA a DNA / RNA hybridy (Beloglazova et al., 2013). V případě inhibice HBV Chen et al.,(2014) nejprve zjišťovali, zda jsou jaterní buňky schopné produkovat SAMHD1. Podle jejich výsledků je SAMHD1 produkován v jádrech jaterních buněk. Na rozdíl od HIV-1 je genom HBV vypuštěn z nukleokapsidy až v jádře, proto je fakt, že se SAMHD1 vyskytuje i v jádrech jaterních buněk stěžejní pro možnost inhibice HBV pomocí SAMHD1. Ve dvou buněčných liniích odvozených od HCC (SMMC-7721 a BEL-7402) ukázali, že se zvyšující se expresí SAMHD1 klesá účinnost virové replikace a tedy roste aktivita inhibice. Následně cílenou mutací v katalyticky aktivním místě HD domény vytvořili enzym neschopný štěpit dNTPs. Jejich výsledky vykazují shodu s antivirovými účinky SAMHD1 na HIV-1. Protože i výsledky Ryoo et al.(2014) nasvědčují tomu, že právě RNázová aktivita SAMHD1 hraje hlavní roli při inhibici HIV-1, kdy dochází k přímé degradaci genomové RNA viru. Avšak na rozdíl od inhibice HBV, blokování replikace HIV-1 začíná těsně po rozbalení viru v cytoplasmě, kdy SAMHD1 začne interagovat s jeho genomovou RNA (Ryoo et al., 2014). Díky studii Chen et al.,(2014) je možné se domnívat, že ačkoliv je nukleová kyselina HBV odhalena až v jádře, interakcí s jaderným SAMHD1 dojde k její degradaci stejně jako v případě degradace RNA genomu HIV-1 v cytoplasmě. Zároveň může i dNTPázová aktivita hrát roli při replikaci HBV, při vzniku cccDNA.

Aktivita SAMHD1 je umlčována specifickými virovými proteiny. V případě HIV-1 nebyl žádný konkrétní protein objeven, ale zcela jistě má tuto funkci Vpx protein, který je produkován virem HIV-2 a SIV (simian immunodeficiency virus) (Hofmann et al., 2012) a zřejmě

obdobnou funkci zastává HBx protein u HBV (Chen et al., 2014). Vpx protein označuje SAMHD1, na C-koncové části, ubiquitinem a tím dává buňce signál pro jeho likvidaci v proteasomu. (Hofmann et al., 2012). Protože HBx protein interaguje s E3 ubiquitin ligázou (Li et al., 2010), je zcela možné, že dokáže SAMHD1 označit a tím předurčit ho k degradaci. Žádné přesvědčivé výsledky o degradaci SAMHD1 pomocí HBx však zatím nebyly publikovány.

4.4 RIG-I

Význam RIG-I byl původně přisuzován hlavně jeho funkci v roli PRR vrozené imunity, kdy funguje jako důležitý faktor při snímání virové nukleové kyseliny a na základě toho jako faktor indukující produkci interferonů typu I a typu III (Yoneyama et al., 2004). Nedávná publikace Sato et al., (2015) však přinesla zajímavé zjištění, že RIG-I dokáže také fungovat jako přímý antivirový faktor proti HBV (Obrázek 5), ale stejně jako Smc nepatří tento faktor do skupiny ISG.



Obrázek 5 Schéma indukce interferonové odpovědi typu III rozpoznáním 5'koncové oblasti pgRNA v místě enkapsidačního signálu (ϵ) pomocí RIG-I. A zároveň model přímé antivirové aktivity RIG-I, kdy jeho vazba k eRNA brání nasednutí HBV P a tím blokuje reverzní transkripci pgRNA.

Po zjištění, že podstatná část pro signalizaci a následnou indukci IFN λ je 5'oblast pgRNA, která nese enkapsidační signál ϵ , vzešla otázka, zda může RIG-I sám o sobě fungovat jako antivirový faktor. Bylo prokázáno, že 5'koncová oblast pgRNA zároveň slouží pro vazbu HBV P proteinu, který zahajuje reverzní transkripci HBV genomu do finální DNA podoby. Tím, že

RIG-I přímo interaguje s ϵ RNA, znemožní interakci virového HBV P a tím zabrání reverzní transkripci pgRNA, aniž by tato akce závisela na zprostředkované IFN λ odpovědi (Sato et al., 2015). Již dříve byly publikovány výsledky, kde Yu et al.,(2015) prokázali, že aby se HBV vyhnul interferonové signalizaci typu I a zahájení antivirové odpovědi využívá přímo virovou polymerázu k blokování RIG-I a TLR3 receptorů (Yu et al., 2010). Zároveň ani Sato et al.,(2015) nezpochybnili možnost inhibice interferonové signalizace typu III přes virové proteiny.

Zablokování exprese virových proteinů (včetně HBx a HBV P) vedlo k nárůstu produkce IFN λ , v porovnání s produkcí IFN λ při použití nemutovaného viru. To ukazuje na fakt, že skutečně některý z virových proteinů snižuje interferonovou produkci (Sato et al., 2015)

4.5 APOBEC

Je to poměrně široká skupina enzymů, jejichž produkce je závislá na interferonové stimulaci (Obrázek 1). Vykazují schopnost modifikovat nukleovou kyselinu a tím dávají vznik nenáhodným mutacím, které následně mají v organismu různý význam, odtud je také odvozen jejich název - apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide, dále zkráceně označený APOBEC, způsobuje deaminaci-odstranění aminoskupiny cytidinu (deoxycytidinu) - vznikne tak uridin (deoxyuridin). Jejich široké spektrum funkcí zahrnuje důležitý efekt uplatňující se v roli antivirové imunity, ale naproti jeho pozitivní roli při virové infekci, mohou být, mimo jiné, jejich účinky zodpovědné za vznik nádorového bujení (Burns et al., 2013). Rodina proteinů je kódována v lidském genomu 11 geny, z nichž se sedm nachází na chromosomu 22 (APOBEC3A, APOBEC3B, APOBEC3C, APOBEC3D, APOBEC3F, APOBEC3G, APOBEC3H) (Jarmuz et al., 2002), další pak na 6. chromosomu (APOBEC2) (Liao et al., 1999), 1. chromosomu (APOBEC4) (Rogozin et al., 2005) a 12. chromosomu (AID a APOBEC1) (Muto et al., 2000).

Přesto, že jsou všechny proteiny APOBEC pro buňku velmi významné, hlavními proteiny s antivirovým účinkem z APOBEC rodiny je skupina APOBEC3. Přelomový objev pro studium antivirových účinků APOBEC bylo zjištění, že APOBEC3G je odpovědný za deaminaci cytidinu ve virové DNA, vznikající při reverzní transkripci viru HIV-I, s deletovaným Vif proteinem (*Viral infectivity factor*), (Sheehy et al., 2002). Vif v nemutovaném stavu brání manifestaci antivirových účinků A3G, pokud se organismus nakazí divokým HIV-1, tento virový protein interaguje s A3G a E3 ligázou, která A3G označuje polyubiquitinací a určuje ho

k degradaci v 26 S proteasomu, také likviduje příslušnou mRNA potřebnou pro translaci a vytvoření nového A3G. To má za následek rapidní snížení množství A3G v infikované buňce a téměř nulový antivirový účinek (Stopak et al., 2003; Yu et al., 2003).

4.5.1 Struktura A3

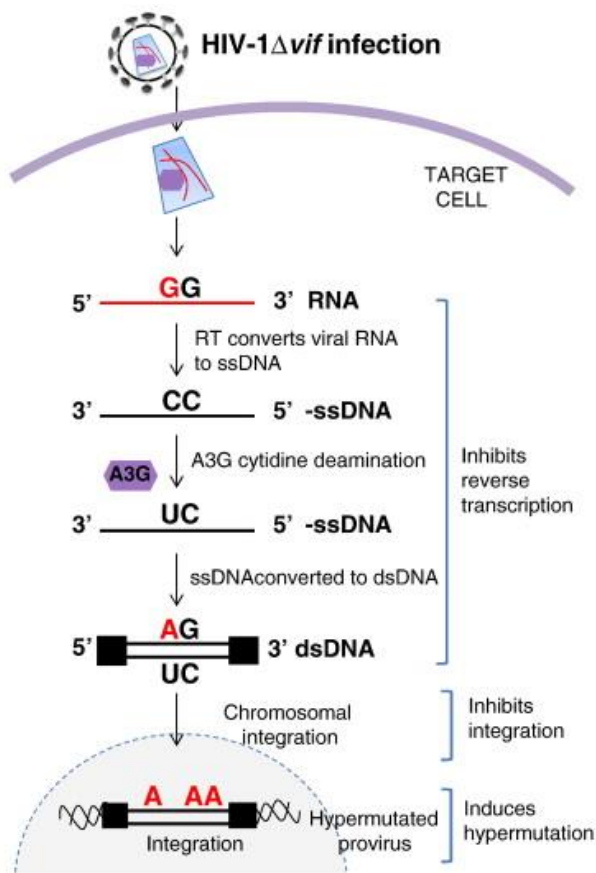
Napříč druhy se struktura A3 proteinů, i přes jejich obdobnou sekvenční charakteristiku, značně liší a to jak v organizaci jejich domén, tak i ve funkci vykonávající v daném organismu. Lidské geny pro celou A3 skupinu jsou tandemově se opakující geny ležící na 22. chromosomu (Jarmuz et al., 2002).

Klasickým strukturálním uspořádání lidských A3 proteinů je přítomnost jedné katalytické domény u A3A, A3H, A3C nebo přítomnost dvou katalytických domén u A3G, A3B, A3D, A3E, A3F, ty jsou vloženy mezi krátkou helikální N-terminální doménu a krátkým C-koncovým spojujícím peptidem. Katalytické domény jsou tvořeny z šesti alfa-helixů a pěti beta-řetězců. Každá katalytická doména má typický motiv His -X-Glu-X₂₃₋₂₈-Pro-Cys-X₂₋₄-Cys, kde histidin a oba cysteiny jsou vysoce konzervované a velmi důležité pro vazbu atomu zinku Zn²⁺, tvořící základ katalytické domény. Glutamová kyselina podporuje tvorbu hydroxidového iontu potřebnou pro deaminázovou aktivitu a X jsou libovolné aminokyseliny, které může řetězec obsahovat. C-terminální doména má především deaminázovou funkci, kdežto N-terminální doména se jeví jako katalyticky neaktivní a její funkcí je vazba RNA (Navarro et al., 2005).

4.5.2 Vliv APOBEC3 na virovou replikaci

A3G si jako svůj substrát vybírá ssDNA, v případě HIV-1 tedy reverzní transkripcí nově nasyntetizovaný mínus řetězec virové DNA, kde způsobí změnu cytidinu (C) za uridin (U). To zajistí, že takové vlákno nebude fungovat jako spolehlivá předloha pro vytvoření plus vlákna. V dosyntetizovaném plus vlákne dojde - vlivem změn v mínus vlákne - k zařazení adenosinu (A) místo guanosinu (G). Protože mutační rychlost je velká a správně zařazených G bývá ve výsledné DNA méně, jak 10% nazývá se tento jev hypermutace (Obrázek 6) (Chelico et al., 2006). Vysoká chybovost, při které vniká množství substitučních mutací a stop kodonů v rozsahu celého genomu, znemožní produkci funkčních virových proteinů, integraci virové DNA do hostitelského genomu a změni životaschopnost a infekčnost viru. Ačkoliv je v životním cyklu HBV také zahrnut krok reverzní transkripce (kdy je pregenomová RNA přepisována do genomové DNA) a mohla by být cílem pro A3G, studie účinku A3G na HBV

přinesly rozdílný pohled na mechanismus inhibice, než který byl účinný na inhibici replikace HIV-1.



Obrázek 6 Mechanismus účinku A3G na Vif deficientní HIV-1 virus. A3G (fialový šestiúhelník) je zabalen do virových částic. V cílové buňce, A3G způsobuje inhibici reverzní transkripce virové RNA, blokování integrace do genomu a indukuje $G \rightarrow A$ hypermutace. V procesu hypermutace, A3G deaminuje deoxycytidin v mínus-vlákně DNA na deoxyuridin, což má za následek změnu G za A v druhém syntetizovaném plus-vlákně. I když se virová DNA do hostitelského genomu začlení, mutace jsou tak vysoké, že nevznikne infekční virové potomstvo. Převzato z (Desimie et al., 2014)

Přesto, že práce Turelli et al., (2004) a dalších ukázaly, že v případě HBV nedochází k hypermutaci G na A a že A3G nemá významný vliv na inhibici replikaci HBV (Jost et al., 2007), význam vlivu A3G na reverzní transkripci u HIV-1 inspiroval pokračující výzkum vlivu A3G na replikaci HBV. Enzym A3G má podle studií Rösler et al., (2005) vliv na inhibici reverzní transkripce editací genomu HBV pouze v minimu transfekovaných HepG2 buněk (HepG2 je buněčná linie odvozená z hepatocelulárního karcinomu). Inhibiční účinek na replikaci HBV se projevuje především ve zvýšení citlivosti pgRNA k nukleázám v přítomnosti A3G, citlivost k těmto enzymům je způsobená nejspíš špatnou enkapsidací pgRNA do nukleokapsidy viru. To se pravděpodobně děje přes interakci A3G s kapsidovým core proteinem (Rösler et al., 2005). Ostatně podobný mechanismus enkapsidace A3G do nových partikul byl popsán u viru HIV-1 s deficientním Vif proteinem. Kdy se A3G enkapsiduje do

nově vznikající virové partikule, po proběhnutí několika interakcí, a to mezi N-terminální cytidin deaminázovou doménou A3G, virovým nukleokapsidovým Gag proteinem, virovou genomovou RNA.

A3G pak při reverzní transkripci genomu HIV-1 v nové buňce působí mutace a nové virové potomstvo se stává pro další hostitelskou buňku neinfekční, ovšem tento mechanismus neplatí pro inhibici replikace HBV. (Burnett and Spearman, 2007; Friew et al., 2009).

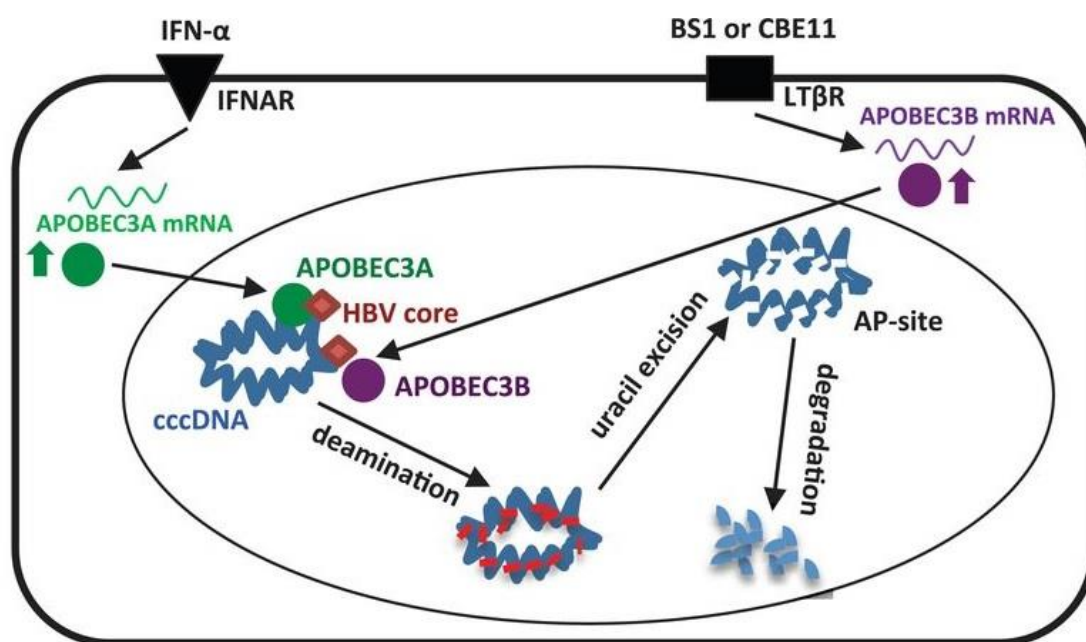
Na zvýšení produkce APOBEC3 při infekci HBV mají vliv $\text{IFN}\alpha$ a také $\text{IFN}\gamma$, což dokazuje fakt, kdy při léčbě infikované buněčné kultury pomocí interferonů dojde k nárůstu mRNA pro A3G, A3B, A3F a A3C (Bonvin et al., 2006). Přibližně stejný princip stimulace produkce A3 platí i pro HIV-1, kdy interferonová odpovědi typu I ($\text{IFN}\alpha$ a β) zvyšuje expresi genů pro A3. (Peng et al., 2006). Názor, že deaminázová aktivita nemá při inhibici replikace HBV velký význam nebyl zcela vyvrácen. To podporují i výsledky, které ukazují, že HBV je schopný inhibovat i A3G zbavený své deaminázové aktivity (Noguchi et al., 2007).

Za cytidin deaminázovou funkci A3G by měla být zodpovědná C-terminální doména, ovšem podle (Newman et al., 2005) není antivirová obrana zprostředkována pouze skrz C-terminální doménu, ale je možná i na deaminázové aktivitě nezávislá antivirová odpověď proti HIV-1 zprostředkovaná přes N-terminální doménu. K podobným závěrům ohledně funkce A3G na inhibici replikace HBV dospěli i Nguyen et al., (2007) kteří ukazují na snižujícím se množství minus řetězce DNA, že A3G dokáže inhibovat replikaci HBV už ve velmi brzkých fázích reverzní transkripce a to v nezávislosti na deaminázové aktivitě (Nguyen et al., 2007). Podle výsledků studie provedené na HIV-1 lze říci, že A3G obsahuje dvě na sobě nezávislé domény, obě plnící funkci antivirové ochrany. Na N-terminální doméně je závislá enkapsidace A3G do virionu, kdy N-terminální doména poskytuje vazebná místa pro vazbu RNA, která podporují na deamináze nezávislou restriční aktivitu A3G, tedy nukleázovou aktivitu u HIV-1 (Bélanger et al., 2013).

Jak bylo uvedeno výše, na replikaci HIV-1 má výrazný vliv A3G a některé další enzymy z rodiny A3. Jsou jimi A3D, A3F a A3H, které také disponují schopností zabalit se do virové částice, působit hypermutace v genomu viru, ale jsou všechny stejně jako A3G citlivé k Vif proteinu (Hultquist et al., 2011). Stejně efektivní působení A3G nebylo v souvislosti s inhibicí replikace HBV prokázáno. Naopak jiní zástupci ze skupiny A3 mají pro inhibici replikace HBV velký význam, jsou jimi A3A, A3B, A3H (Henry et al., 2009). Důležité je, že jak A3A tak A3B,

se mohou nacházet uvnitř jader buněk, tím získávají výhodu přímo interagovat s virovou cccDNA, která představuje velký problém při perzistujících infekcích HBV.

Současná léčba infekce HBV je založena především na inhibitech reverzní transkripce. Ta sice zastaví produkci nových kompletních virových částic, ale nevymýtí virus zcela, protože necílí na samotnou cccDNA. Už dříve před objevem působení A3A a A3B na replikaci HBV mělo podávání IFN α při klasické léčbě chronické hepatitidy B poměrně úspěšné výsledky. Léčba s pomocí IFN α má sice dost vedlejších účinků, ale často vede k vyléčení chronické hepatitidy. Nebylo ale zřejmé, jaký mechanismus vede k vyléčení pacientů. Oba enzymy (A3A, A3B) jsou v hepatocytech nakažených HBV pozitivně regulovány aktivací IFN α (Lucifora et al., 2014). To že jsou A3A i A3B lokalizovány v jádře a mohou ovlivňovat stabilitu cccDNA potvrdily studie Lucifora et al., (2014). Dále ukázali, že A3A je v interakci se střední částí HBV core proteinu a je schopný navázat se k cccDNA minichromosomu (Obrázek 7)



Obrázek 7 Znárodnění signalizace IFN- α a LT β R, která v hepatocytech vede k degradaci HBV cccDNA. Interakcí A3A a A3B s HBV core proteinem zachytávají episomální cccDNA a vyvolávají v ní rozsáhlé cytidinové deaminace, což poté vede k degradaci DNA. Převzato z (Lucifora et al., 2014)

Protože substrátem pro deaminázy je ssDNA, je možné, že A3A a A3B cílí virovou DNA už během transkripce v jádře, kdy je přechodně jednovláknová. Vysoké dávky IFN α , ukazují nárůst exprese A3A a A3B. Ty se vážou s HBV core proteinem, v jádře pak interagují s virovým minichromosomem a probíhá deaminace cytosinu na uracil v cccDNA, mutovaná místa jsou vyštěpena buněčným opravným mechanismem - DNA glykosilázami. Tím vznikají apurinová/apyrimidinová (AP) místa. Výsledná akce ale nevede k opravě těchto chyb, namísto

toho jsou povolány AP-endonukleázy, rozpoznají vyštěpená místa a cccDNA úplně rozštěpí. Tím je zajištěna specifická necytopatická likvidace cccDNA v infikovaných buňkách. Výzkum Xia et al.,(2016) ukazuje, že po jaterní biopsii pacientů s akutní i fulminantní hepatitidou, se v jejich vzorcích po in situ hybridizaci objevují mRNA pro A3A a A3B, na rozdíl od pacientů, kteří infikovaní nebyli nebo kteří trpěli chronickou hepatitidou. U pacientů se spontánním vyléčením byly především nalezeny HBV-specifické T-lymfocyty, které produkují IFN γ a TNF- α . Tyto cytokiny působí zvýšení produkce A3A a A3B, které úspěšně degradují virovou cccDNA, čímž dojde k samovolnému vyléčení hepatitidy B. Cílení samotné cccDNA a její zničení, je při léčbě HBV velmi žádoucí, proto Lucifora et al.,(2014) hledali možného kandidáta za IFN γ nebo TNF- α , které se nachází u spontánně vyléčených pacientů, ale při samotné léčbě by působily těžké vedlejší účinky. Testovali aktivaci lymphotoxin β receptoru jako možného terapeutického prostředku, který by nahradil stávající IFN α s četnými vedlejšími účinky. Podle jejich výsledků je zřejmé, že aktivace lymphotoxin β receptoru (Obrázek 7) vede k produkci především A3B a následnému zničení cccDNA.

4.6 BST2

Gen pro BST2 se nachází na lidském 19. chromosomu a kromě člověka se vyskytuje i u dalších placentálních savců je další ze skupiny ISG (Obrázek 1). Název BST2 mu byl určen podle místa výskytu, bone marrow stromal cell antigen 2, tedy antigen stromálních buněk kostní dřeně. BST2 není exprimován jen buňkami kostní dřeně, ale je distribuován napříč mnoha různými typy tkání a buněčných linií (Ishikawa et al., 1995). V literatuře ho můžeme najít i pod dalšími názvy jako tetherin, CD317 nebo HM1.24. Ačkoli byl známý poměrně dlouhou dobu, jeho antivirová aktivita byla odhalena až v roce 2008, kdy (Neil et al., 2008) hledali vhodného kandidáta buněčných proteinů, který brání uvolnění viru HIV-1 z infikovaných buněk. Jeho antagonistou je v případě HIV-1 virový protein Vpu. BST2 je součástí buněčné membrány nebo je na membráně produkován a jeho produkce je indukována IFN α . Od objevení jeho antivirové funkce bylo uskutečněno mnoho dalších studií zabývajících se jeho působením.

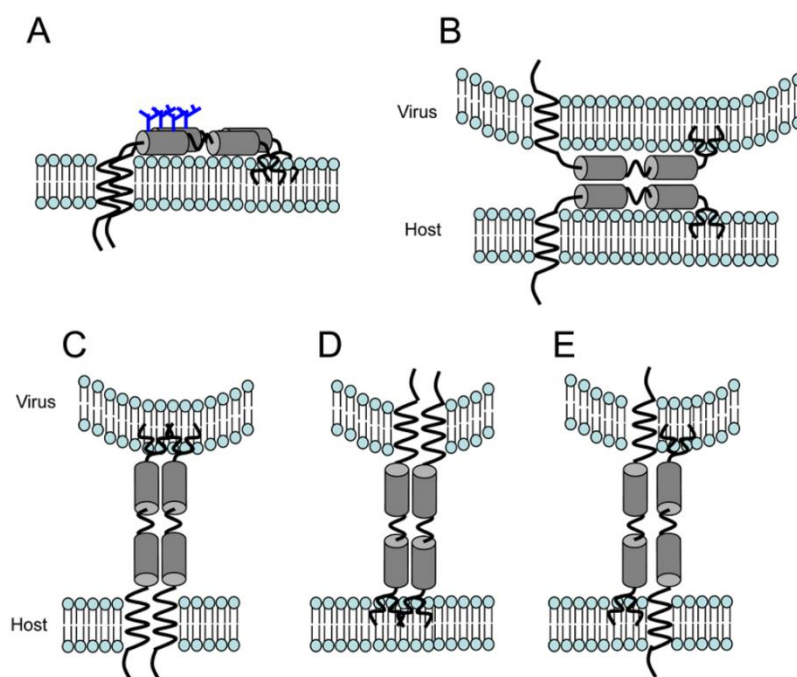
4.6.1 Struktura BST2

Je to membránovým protein, který se nachází v oblasti lipidových raftů, jednou prochází přes membránu a jako zralý protein nabývá homodimerní konformace. Protein má na N-konci tyrozinový (YxY) motiv zasahující do cytoplasmy, který se účastní klatrinem zprostředkované endocytózy při internalizaci proteinu (Rollason et al., 2007). Následuje N-terminální

transmembránová α -helikální kotva. Do extracelulárního prostoru vybíhá C-koncová část se dvěma cukernými zbytky, coiled-coil doména (struktura s dvěma α -helixy), a je ukončena (glykosilfosfatidilinositolovou) GPI kotvou. GPI kotva je přidávána v endoplasmatickém retikulu a slouží jako lokalizační signál (Kupzig et al., 2003). Jako důležitá struktura při virové inhibici se prokázala dimerní α -helixová ekto-doména, která funguje jakožto složka blokující uvolnění virových částic z buňky a při zprostředkování jejich endocytózy. Cílenými mutacemi byla zajištěna nestabilita dimerního uspořádání proteinu (především ekto-domény) a tím byla prokazatelně snížena schopnost BST2 účinně blokovat virové uvolnění (Hammonds et al., 2012). Naopak N-terminální transmembránová kotva je klíčová pro blokaci funkce BST2 zprostředkovanou virovým proteinem Vpu (Rong et al., 2009).

4.6.2 Vliv BST2 na virovou replikaci

Jak již bylo prokázáno dříve, BST2 brání šíření i jiných obalených virů než pouze HIV-1. Tetherin zasahuje i proti virům Ebola, SIV a Marburg (Jouvenet et al., 2009) nebo také viru hepatitidy C (Amet et al., 2014). Tato zjištění přivedla skupiny vědců ke zkoumání efektu BST2 na další obalený virus, kterým je právě HBV, ovšem s tím rozdílem, že HBV získává svůj obal už v MBV, nikoliv na buněčné membráně. Doposud bylo provedeno jen poměrně málo studií zabývajících se tímto tématem, ale i přesto přinesly výsledky, které ukazují, že BST2 má vliv na šíření virového potomstva z infikovaných buněk (Yan et al., 2015). Jelikož je HIV-1 obalený virus, virové částice, které dávají vznik novým virionům, se shromažďují pod membránou hostitelské buňky, z té po předchozím sestavení vypučí ven a hostitelskou membránu použijí jako svůj virový obal. Úspěšné opuštění hostitelské buňky, a tím pádem i možnost dalšího šíření, umožňuje viru HIV-1 jeho specifický Vpu protein. Pokud je virus deficientní na Vpu, rychle klesá jeho infekčnost, protože vypuštění brání právě hostitelský buněčný faktor BST2. Schopnost BST2 blokovat vypuštění viru z buňky závisí na jeho specifické struktuře. Do membrány pučícího virionu se zabuduje jedna kotva tetherinu, zatímco druhá zůstává připevněna k hostitelské membráně a fyzicky zachytí spojený s buňkou (Neil et al., 2008). Jako pravděpodobný model se ukazuje, že tetherin preferuje zabudování dvojice GPI kotev do obalu virionu, zatímco dvojice transmembránových kotev zůstává v membráně hostitelské buňky (Obrázek 8) (Venkatesh and Bieniasz, 2013).



Obrázek 8 Tetherin zachycující nově formované viriony na membráně buňky. (A) Tetherin v homodimerní konformaci, který při inhibici pučení nových virionů funguje buď jako paralelní homodimer (B, C, D) nebo jako dimer s opačně orientovanými doménami (E). Pravděpodobněji do pučících virionů zabudovává GPI kotvu a transmembránová kotva zůstává v membráně buňky (C), ale není vyloučen opačný způsob uchycování (D). (B) a (E) konformace jsou nejméně pravděpodobné scénáře uchycování virionů, protože nejlepší účinek mají dvě stejné domény v membráně virionu. Převzato z (Gupta and Towers, 2010)

Pro to, aby protein inhiboval vypuštění viru z buňky, není vyžadován žádný kofaktor ani rozeznání specifického virového produktu. Zachycení viru působí jednoduše přes inkorporaci tetherinu do virového obalu, protože tetherin se shromažďuje v místech, kde viriony pučí ven z buňky. Stejně tak je obaleným virem HBV, což může značit, že tetherin zastává funkci blokování uvolňování virionů z buňky i u tohoto viru. Na rozdíl od maturace HIV-1 probíhá sestavování virionů HBV v MVB. Nebylo zřejmé, zda se tetherin nachází uvnitř MVB nebo jestli blokuje výstup viru až na buněčné membráně. Data Yan et al., (2015) ukazují, že pučení virionů je tetherinem blokováno už v MVB váčcích. Yan et al.,(2015) použili pro svůj výzkum linii HepAD38, což je buněčná linie, ve které je HBV schopný replikace v podmínkách, které jsou regulovatelné tetracyklinem. Těmto buňkám s prokázanou replikací HBV podávali tři typy interferonu, IFN α , IFN γ , IFN λ a výsledkem byla zvýšená produkce tetherinu po podání každého z nich. Buňky HepAD38, které trvale expimovaly tetherin a zároveň v nich probíhala replikace HBV, měly v porovnání s kontrolními buňkami shodnou kinetiku replikace DNA a formování nahých nukleokapsid nebo produkce subgenomových partikulí, ale na rozdíl od kontrol se značně snížila celková produkce virionů.

To značí, že tetherin zastává - stejně jako u HIV-1 - funkci blokování uvolňování virionů z buňky i u HBV. Ačkoli má BST2 efekt na snižování sekretovaného virového potomstva, není jeho účinek natolik silný, aby dokázal zcela zastavit šíření virionů. Podobně jako HIV-1 nebo Ebola virus (Jouvenet et al., 2009), i HBV kóduje protein, který má na tetherin inhibiční efekt. Miyakawa et al.,(2015) imunoprecipitační analýzou prokázali, že inhibice teherinu je možná v závislosti na přímé interakci virových strukturních proteinů LHBs a SHBs (velký a malý HBs protein) s tetherinem (Obrázek 2). Vazbou HBs proteinů s tetherinem, je znemožněna jeho dimerizace a je deaktivována jeho antivirová funkce. Naproti tomuto tvrzení stojí studie Lv et al.,(2015), kteří fluorescenčním značením určili lokalizaci BST2 a virových proteinů. V buňkách také našli společnou lokalizaci LHBs a BST2, a tato uskupení určili jako místa, kde je skládání virionů pomocí BST2 blokováno, nikoliv jako blokování BST2 pomocí virových HBs proteinů. V souvislosti s inhibicí BST2, označili virový HBx protein, který nesnižuje hladiny BST2 v buňkách, ale je zodpovědný za blokování jeho antivirové aktivity.

Kromě přímého blokování viru má BST2 také další funkci, a tou je buněčná signalizace, při které sám funguje jako senzor virové infekce. Tato aktivita byla ovšem zatím sledována pouze u viru HIV-1. Po zachycení pučících virionů jsou na BST2 odhaleny tyrozinové zbytky, které slouží, jako substrát pro Syk tyrozin kinázu. Fosforylace BST2 indukuje kaskádu reakcí vedoucích k aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B, což má za následek produkci zánětlivých faktorů jako je IL6 nebo IFN α/β (Galão et al., 2012). Takto je ale BST2 aktivní pouze ve Vpu deficientních HIV-1 virech Vpu je stejně jako BST2 membránový protein, obsahuje N-terminální transmembránovou doménu a C-terminální cytoplasmatickou doménu tvořenou dvěma α -helixy (McNatt et al., 2013). Při inhibici BST2 virovým Vpu dochází k přímé vazbě transmembránových domén obou proteinů. Vpu není schopný BST2 pouze zachytit, ale pomocí svého druhého α -helixu a jeho specifického ExxxLV motivu vytěsňuje BST2 z místa pučení virionů, a následně dochází jeho destrukci (Janvier et al., 2011). Důkazy, že i HBV působí proti inhibici BST2, existují, ale přesný mechanismus účinku virových proteinů, zřejmě HBx, proti BST2 zatím není znám. Oproti působení Vpu však HBx nezpůsobuje přímou destrukci BST2, naopak způsobuje hromadění BST2 u membrány MVB (Lv et al., 2015).

5 Závěr

Cílem této práce bylo shrnout vliv restričních buněčných faktorů na replikaci HBV. Z celé řady faktorů, které jsou stimulované interferony, zde byly popsány tři významné restriční faktory, kterými jsou SAMHD1, APOBEC a BST2. Dále byl uveden nově objevený vliv buněčných faktorů, které však nejsou ISG a to Smc a RIG-I. Každý z nich se projevuje odlišnými antivirovými účinky, které se uplatňují v různých fázích replikačního cyklu HBV. Detailnější poznatky o jejich fungování by mohly hrát důležitou roli při nalézání nových léčiv proti chronické hepatitidě B.

Nedávno objevené inhibiční působení Smc5/6 na aktivaci transkripce genomu HBV, ačkoliv je inhibováno produkcí virového HBx, ukazuje další možný směr výzkumu látek využitelných proti HBV.

Vliv SAMHD1 na replikaci HBV je stále téměř neprozkoumanou kapitolou. Zdá se, že inhibice pomocí SAMHD1 začíná už v brzkých fázích infekce po uvolnění DNA z nukleokapsidy. Pokud by více studií potvrdilo efekt inhibice, který popisuje Chen et al., (2014) mohl by tento objev přispět k dalšímu poznání, jak lze efektivně degradovat virovou cccDNA nebo alespoň omezit produkci virových RNA.

Jeden z velmi slibných kandidátů do budoucího boje s HBV je skupina A3, při stimulaci buněk interferony α a γ dochází ke zvýšení mRNA pro téměř všechny enzymy skupiny A3. Také bylo prokázáno, že mechanismus inhibice replikace HBV nesouvisí s mechanismem působení A3 jako u viru HIV-1, kdy způsobují A3 hypermutace G \rightarrow A v genomu (Noguchi et al., 2007). Jeden z velmi významných objevů, je identifikace důležité aktivity A3, přesněji A3A a A3B. Při testování jejich účinku na replikaci HBV byla v závislosti na jejich zvýšené produkci degradována cccDNA. Souvisí to s tím, že A3A a A3B se vyskytují v jádře, kde dokáží interagovat s virovou cccDNA, a jejich deaminázovou aktivitou virový genom mutují. Výsledkem je následná degradace cccDNA buněčným opravným mechanismem (Lucifora et al., 2014). Úspěšně interagovat s virovou cccDNA a degradovat ji, je v současnosti jediná cesta, jak vyléčit infekci HBV a jeden ze stěžejních cílů pro budoucí výzkum. Nic jiného není při infekci HBV, tak závažné jako přetrvávání cccDNA v hepatocytech, protože díky intaktní cccDNA se může HBV neustále replikovat. Je zřejmé, že při akutní hepatitidě musí být buňky nesoucí cccDNA nějakým účinkem imunitního systému zničeny, pravděpodobně se tak děje díky včasnému zásahu cytotoxických T lymfocytů (Thimme et al., 2003), ale také díky

necytopatickému zásahu indukovaného interferonovou stimulací, jak bylo prokázáno už dříve (Wieland et al., 2000). A studie zkoumající účinky restričních faktorů tento fakt potvrzují.

Aktivita BST2 sice při infekci HBV nevyřeší problém s přetrvávající cccDNA, ale dokáže zabránit rozšiřování nových virionů do dalších buněk. Jak ale ukazují současné studie, jeho aktivita je pravděpodobně brzděna některým z virových produktů. Protože samotný BST2 nezaručí úplnou inhibici šíření virionů (Lv et al., 2015).

Časné interakce mezi hostitelskou buňkou a virem, zejména indukce vrozené antivirové imunity, hrají klíčovou roli v zastavení šíření HBV. Je tedy zřejmé, že výzkum interferony indukovaných faktorů může hrát klíčovou roli při vývoji nových léčiv pro pacienty infikované chronickou hepatitidou B. Hlavním cílem těchto terapeutik by mělo být zničení cccDNA. Ačkoliv jsou přesné poznatky o tvorbě i degradaci zatím téměř v počátcích, je jasné, že dokud se hepatocyty nezbaví této intaktní virové struktury, není nikdy zcela jisté, zda přetrvávající infekce nebude směřovat k cirhóze jater, fibróze jater nebo k jaternímu karcinomu.

6 Seznam použité literatury

- Amet, T., Byrd, D., Hu, N., Sun, Q., Li, F., Zhao, Y., Hu, S., Grantham, A., and Yu, Q. (2014). BST-2 expression in human hepatocytes is inducible by all three types of interferons and restricts production of hepatitis C virus. *Curr. Mol. Med.* 14, 349–360.
- Ballana, E., and Esté, J.A. (2015). SAMHD1: At the Crossroads of Cell Proliferation, Immune Responses, and Virus Restriction. *Trends Microbiol.* 23, 680–692.
- Bélanger, K., Savoie, M., Gerpe, M.C.R., Couture, J.-F., and Langlois, M.-A. (2013). Binding of RNA by APOBEC3G controls deamination-independent restriction of retroviruses. *Nucleic Acids Res.* 41, 7438–7452.
- Beloglazova, N., Flick, R., Tchigvintsev, A., Brown, G., Popovic, A., Nocek, B., and Yakunin, A.F. (2013). Nuclease Activity of the Human SAMHD1 Protein Implicated in the Aicardi-Goutières Syndrome and HIV-1 Restriction. *J. Biol. Chem.* 288, 8101–8110.
- Bertoletti, A., and Ferrari, C. (2011). Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection. *Gut* gutjnl – 2011–301073.
- Bonvin, M., Achermann, F., Greeve, I., Stroka, D., Keogh, A., Inderbitzin, D., Candinas, D., Sommer, P., Wain-Hobson, S., Vartanian, J.-P., et al. (2006). Interferon-inducible expression of APOBEC3 editing enzymes in human hepatocytes and inhibition of hepatitis B virus replication. *Hepatology* 43, 1364–1374.
- Burnett, A., and Spearman, P. (2007). APOBEC3G multimers are recruited to the plasma membrane for packaging into human immunodeficiency virus type 1 virus-like particles in an RNA-dependent process requiring the NC basic linker. *J. Virol.* 81, 5000–5013.
- Burns, M.B., Lackey, L., Carpenter, M.A., Rathore, A., Land, A.M., Leonard, B., Refsland, E.W., Kotandeniya, D., Tretyakova, N., Nikas, J.B., et al. (2013). APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer. *Nature* 494, 366–370.
- Chelico, L., Pham, P., Calabrese, P., and Goodman, M.F. (2006). APOBEC3G DNA deaminase acts processively 3' → 5' on single-stranded DNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 392–399.
- Chen, Z., Zhu, M., Pan, X., Zhu, Y., Yan, H., Jiang, T., Shen, Y., Dong, X., Zheng, N., Lu, J., et al. (2014). Inhibition of Hepatitis B virus replication by SAMHD1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450, 1462–1468.
- Choi, J., Ryoo, J., Oh, C., Hwang, S., and Ahn, K. (2015). SAMHD1 specifically restricts retroviruses through its RNase activity. *Retrovirology* 12, 46.
- Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., and Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244, 359–362.
- Decorsière, A., Mueller, H., van Breugel, P.C., Abdul, F., Gerossier, L., Beran, R.K., Livingston, C.M., Niu, C., Fletcher, S.P., Hantz, O., et al. (2016). Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor. *Nature* 531, 386–389.

- Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R.G., and Silverman, R.H. (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon α , β , or γ using oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15623–15628.
- Desimmie, B.A., Delviks-Frankenberry, K.A., Burdick, R.C., Qi, D., Izumi, T., and Pathak, V.K. (2014). Multiple APOBEC3 restriction factors for HIV-1 and one Vif to rule them all. *J. Mol. Biol.* 426, 1220–1245.
- Durbin, R.K., Kotenko, S.V., and Durbin, J.E. (2013). Interferon induction and function at the mucosal surface. *Immunol. Rev.* 255, 25–39.
- Fattovich, G., Bortolotti, F., and Donato, F. (2008). Natural history of chronic hepatitis B: Special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J. Hepatol.* 48, 335–352.
- Friew, Y.N., Boyko, V., Hu, W.-S., and Pathak, V.K. (2009). Intracellular interactions between APOBEC3G, RNA, and HIV-1 Gag: APOBEC3G multimerization is dependent on its association with RNA. *Retrovirology* 6, 56.
- Galão, R.P., Le Tortorec, A., Pickering, S., Kueck, T., and Neil, S.J.D. (2012). Innate sensing of HIV-1 assembly by Tetherin induces NF κ B-dependent proinflammatory responses. *Cell Host Microbe* 12, 633–644.
- Goldstone, D.C., Ennis-Adeniran, V., Hedden, J.J., Groom, H.C.T., Rice, G.I., Christodoulou, E., Walker, P.A., Kelly, G., Haire, L.F., Yap, M.W., et al. (2011). HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nature* 480, 379–382.
- Gupta, R.K., and Towers, G.J. (2010). Ultra Structural Characterisation of Tetherin - a Protein Capable of Preventing Viral Release from the Plasma Membrane. *Viruses* 2, 987–994.
- Hammonds, J., Ding, L., Chu, H., Geller, K., Robbins, A., Wang, J.-J., Yi, H., and Spearman, P. (2012). The Tetherin/BST-2 Coiled-Coil Ectodomain Mediates Plasma Membrane Microdomain Localization and Restriction of Particle Release. *J. Virol.* 86, 2259–2272.
- Henry, M., Guétard, D., Suspène, R., Rusniok, C., Wain-Hobson, S., and Vartanian, J.-P. (2009). Genetic Editing of HBV DNA by Monodomain Human APOBEC3 Cytidine Deaminases and the Recombinant Nature of APOBEC3G. *PLOS ONE* 4, e4277.
- Hirano, T. (2006). At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 311–322.
- Hofmann, H., Logue, E.C., Bloch, N., Daddacha, W., Polsky, S.B., Schultz, M.L., Kim, B., and Landau, N.R. (2012). The Vpx Lentiviral Accessory Protein Targets SAMHD1 for Degradation in the Nucleus. *J. Virol.* 86, 12552–12560.
- Honda, K., and Taniguchi, T. (2006). IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 644–658.
- Hsu, S.-C., Chang, M.-H., Ni, Y.-H., Hsu, H.-Y., and Lee, C.-Y. (1993). Horizontal transmission of hepatitis B virus in children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 16, 66–69.
- Hultquist, J.F., Lengyel, J.A., Refsland, E.W., LaRue, R.S., Lackey, L., Brown, W.L., and Harris, R.S. (2011). Human and rhesus APOBEC3D, APOBEC3F, APOBEC3G, and

APOBEC3H demonstrate a conserved capacity to restrict Vif-deficient HIV-1. *J. Virol.* 85, 11220–11234.

Ishikawa, J., Kaisho, T., Tomizawa, H., Lee, B.O., Kobune, Y., Inazawa, J., Oritani, K., Itoh, M., Ochi, T., Ishihara, K., et al. (1995). Molecular cloning and chromosomal mapping of a bone marrow stromal cell surface gene, BST2, that may be involved in pre-B-cell growth. *Genomics* 26, 527–534.

Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat. Immunol.* 16, 343–353.

Janvier, K., Pelchen-Matthews, A., Renaud, J.-B., Caillet, M., Marsh, M., and Berlioz-Torrent, C. (2011). The ESCRT-0 component HRS is required for HIV-1 Vpu-mediated BST-2/tetherin down-regulation. *PLoS Pathog.* 7, e1001265.

Jarmuz, A., Chester, A., Bayliss, J., Gisbourne, J., Dunham, I., Scott, J., and Navaratnam, N. (2002). An Anthropoid-Specific Locus of Orphan C to U RNA-Editing Enzymes on Chromosome 22. *Genomics* 79, 285–296.

Jost, S., Turelli, P., Mangeat, B., Protzer, U., and Trono, D. (2007). Induction of Antiviral Cytidine Deaminases Does Not Explain the Inhibition of Hepatitis B Virus Replication by Interferons. *J. Virol.* 81, 10588–10596.

Jouvenet, N., Neil, S.J.D., Zhadina, M., Zang, T., Kratovac, Z., Lee, Y., McNatt, M., Hatzioannou, T., and Bieniasz, P.D. (2009). Broad-Spectrum Inhibition of Retroviral and Filoviral Particle Release by Tetherin. *J. Virol.* 83, 1837–1844.

Kao, J.-H. (2002). Hepatitis B viral genotypes: Clinical relevance and molecular characteristics. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 17, 643–650.

Kao, J.-H., and Chen, D.-S. (2006). HBV genotypes: Epidemiology and implications regarding natural history. *Curr. Hepat. Rep.* 5, 5–13.

Kawai, T., and Akira, S. (2006). Innate immune recognition of viral infection. *Nat. Immunol.* 7, 131–137.

Kondo, N., Kuramitsu, S., and Masui, R. (2004). Biochemical Characterization of TT1383 from *Thermus thermophilus* Identifies a Novel dNTP Triphosphohydrolase Activity Stimulated by dATP and dTTP. *J. Biochem. (Tokyo)* 136, 221–231.

Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2011). Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *Int. Rev. Immunol.* 30, 16–34.

Kupzig, S., Korolchuk, V., Rollason, R., Sugden, A., Wilde, A., and Banting, G. (2003). Bst-2/HM1.24 Is a Raft-Associated Apical Membrane Protein with an Unusual Topology. *Traffic* 4, 694–709.

Laguette, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringeard, M., Chable-Bessia, C., Ségéral, E., Yatim, A., Emiliani, S., Schwartz, O., and Benkirane, M. (2011). SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 474, 654–657.

- Lau, J.Y., and Wright, T.L. (1993). Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. *Lancet Lond. Engl.* 342, 1335–1340.
- Lavanchy, D. (2004). Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J. Viral Hepat.* 11, 97–107.
- Lee, W.M. (1997). Hepatitis B Virus Infection. *N. Engl. J. Med.* 337, 1733–1745.
- Lee, M.-H., Yang, H.-I., Liu, J., Batrla-Utermann, R., Jen, C.-L., Illoeje, U.H., Lu, S.-N., You, S.-L., Wang, L.-Y., Chen, C.-J., et al. (2013). Prediction models of long-term Cirrhosis and hepatocellular carcinoma risk in chronic hepatitis B patients: Risk scores integrating host and virus profiles. *Hepatology* 58, 546–554.
- Li, T., Robert, E.I., van Breugel, P.C., Strubin, M., and Zheng, N. (2010). A promiscuous α -helical motif anchors viral hijackers and substrate receptors to the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase machinery. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 105–111.
- Liao, W., Hong, S.H., Chan, B.H., Rudolph, F.B., Clark, S.C., and Chan, L. (1999). APOBEC-2, a cardiac- and skeletal muscle-specific member of the cytidine deaminase supergene family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260, 398–404.
- Lin, F., and Young, H.A. (2014). Interferons: Success in anti-viral immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 25, 369–376.
- Lucifora, J., Xia, Y., Reisinger, F., Zhang, K., Stadler, D., Cheng, X., Sprinzl, M.F., Koppensteiner, H., Makowska, Z., Volz, T., et al. (2014). Specific and Nonhepatotoxic Degradation of Nuclear Hepatitis B Virus cccDNA. *Science* 343, 1221–1228.
- Lv, M., Zhang, B., Shi, Y., Han, Z., Zhang, Y., Zhou, Y., Zhang, W., Niu, J., and Yu, X.-F. (2015). Identification of BST-2/tetherin-induced hepatitis B virus restriction and hepatocyte-specific BST-2 inactivation. *Sci. Rep.* 5, 11736.
- MacMicking, J.D. (2012). Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 367–382.
- McNatt, M.W., Zang, T., and Bieniasz, P.D. (2013). Vpu Binds Directly to Tetherin and Displaces It from Nascent Virions. *PLOS Pathog* 9, e1003299.
- Miyakawa, K., Matsunaga, S., Watashi, K., Sugiyama, M., Kimura, H., Yamamoto, N., Mizokami, M., Wakita, T., and Ryo, A. (2015). Molecular dissection of HBV evasion from restriction factor tetherin: A new perspective for antiviral cell therapy. *Oncotarget* 6, 21840–21852.
- Muto, T., Muramatsu, M., Taniwaki, M., Kinoshita, K., and Honjo, T. (2000). Isolation, tissue distribution, and chromosomal localization of the human activation-induced cytidine deaminase (AID) gene. *Genomics* 68, 85–88.
- Navarro, F., Bollman, B., Chen, H., König, R., Yu, Q., Chiles, K., and Landau, N.R. (2005). Complementary function of the two catalytic domains of APOBEC3G. *Virology* 333, 374–386.
- Neil, S.J.D., Zang, T., and Bieniasz, P.D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451, 425–430.

- Newman, E.N.C., Holmes, R.K., Craig, H.M., Klein, K.C., Lingappa, J.R., Malim, M.H., and Sheehy, A.M. (2005). Antiviral function of APOBEC3G can be dissociated from cytidine deaminase activity. *Curr. Biol. CB* 15, 166–170.
- Nguyen, D.H., Gummuluru, S., and Hu, J. (2007). Deamination-Independent Inhibition of Hepatitis B Virus Reverse Transcription by APOBEC3G. *J. Virol.* 81, 4465–4472.
- Ni, Y., Lempp, F.A., Mehrle, S., Nkongolo, S., Kaufman, C., Fälth, M., Stindt, J., Königer, C., Nassal, M., Kubitz, R., et al. (2014). Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology* 146, 1070–1083.
- Noguchi, C., Hiraga, N., Mori, N., Tsuge, M., Imamura, M., Takahashi, S., Fujimoto, Y., Ochi, H., Abe, H., Maekawa, T., et al. (2007). Dual effect of APOBEC3G on Hepatitis B virus. *J. Gen. Virol.* 88, 432–440.
- Orito, E., Mizokami, M., Sakugawa, H., Michitaka, K., Ishikawa, K., Ichida, T., Okanoue, T., Yotsuyanagi, H., and Iino, S. (2001). A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes B and C. *Hepatology* 33, 218–223.
- Peng, G., Lei, K.J., Jin, W., Greenwell-Wild, T., and Wahl, S.M. (2006). Induction of APOBEC3 family proteins, a defensive maneuver underlying interferon-induced anti-HIV-1 activity. *J. Exp. Med.* 203, 41–46.
- Randow, F., MacMicking, J.D., and James, L.C. (2013). Cellular Self-Defense: How Cell-Autonomous Immunity Protects Against Pathogens. *Science* 340.
- Rogozin, I.B., Basu, M.K., Jordan, I.K., Pavlov, Y.I., and Koonin, E.V. (2005). APOBEC4, a new member of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases predicted by computational analysis. *Cell Cycle Georget. Tex* 4, 1281–1285.
- Rollason, R., Korolchuk, V., Hamilton, C., Schu, P., and Banting, G. (2007). Clathrin-mediated endocytosis of a lipid-raft-associated protein is mediated through a dual tyrosine motif. *J. Cell Sci.* 120, 3850–3858.
- Rong, L., Zhang, J., Lu, J., Pan, Q., Lorgeoux, R.-P., Aloysius, C., Guo, F., Liu, S.-L., Wainberg, M.A., and Liang, C. (2009). The transmembrane domain of BST-2 determines its sensitivity to down-modulation by human immunodeficiency virus type 1 Vpu. *J. Virol.* 83, 7536–7546.
- Rösler, C., Köck, J., Kann, M., Malim, M.H., Blum, H.E., Baumert, T.F., and von Weizsäcker, F. (2005). APOBEC-mediated interference with hepadnavirus production. *Hepatol. Baltim. Md* 42, 301–309.
- Ryoo, J., Choi, J., Oh, C., Kim, S., Seo, M., Kim, S., Seo, D., Kim, J., White, T.E., Brandariz-núñez, A., et al. (2014). The ribonuclease activity of SAMHD1 is required for HIV-1 restriction. *Nat. Med.* 20, 936–941.
- Said, Z.N.A. (2011). An overview of occult hepatitis B virus infection. *World J. Gastroenterol. WJG* 17, 1927–1938.
- Samuel, C.E. (2001). Antiviral Actions of Interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 778–809.

- Sato, S., Li, K., Kameyama, T., Hayashi, T., Ishida, Y., Murakami, S., Watanabe, T., Iijima, S., Sakurai, Y., Watashi, K., et al. (2015). The RNA Sensor RIG-I Dually Functions as an Innate Sensor and Direct Antiviral Factor for Hepatitis B Virus. *Immunity* 42, 123–132.
- Seeger, C., and Mason, W.S. (2000). Hepatitis B Virus Biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 51–68.
- Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., Choi, J.D., and Malim, M.H. (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418, 646–650.
- Stenglein, M.D., Burns, M.B., Li, M., Lengyel, J., and Harris, R.S. (2010). APOBEC3 proteins mediate the clearance of foreign DNA from human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 222–229.
- Stopak, K., de Noronha, C., Yonemoto, W., and Greene, W.C. (2003). HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol. Cell* 12, 591–601.
- Sureau, C., and Salisse, J. (2013). A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus A-determinant. *Hepatology* 57, 985–994.
- Sze, A., Olganier, D., Lin, R., van Grevenynghe, J., and Hiscott, J. (2013). SAMHD1 host restriction factor: a link with innate immune sensing of retrovirus infection. *J. Mol. Biol.* 425, 4981–4994.
- Thimme, R., Wieland, S., Steiger, C., Ghayeb, J., Reimann, K.A., Purcell, R.H., and Chisari, F.V. (2003). CD8+ T Cells Mediate Viral Clearance and Disease Pathogenesis during Acute Hepatitis B Virus Infection. *J. Virol.* 77, 68–76.
- Tomasello, E., Pollet, E., Vu Manh, T.-P., Uzé, G., and Dalod, M. (2014). Harnessing mechanistic knowledge on beneficial versus deleterious IFN-I effects to design innovative immunotherapies targeting cytokine activity to specific cell types. *Microb. Immunol.* 5, 526.
- Turelli, P., Mangeat, B., Jost, S., Vianin, S., and Trono, D. (2004). Inhibition of Hepatitis B Virus Replication by APOBEC3G. *Science* 303, 1829–1829.
- Watashi, K., Urban, S., Li, W., and Wakita, T. (2014). NTCP and Beyond: Opening the Door to Unveil Hepatitis B Virus Entry. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 2892–2905.
- White, T.E., Brandariz-Núñez, A., Valle-Casuso, J.C., Amie, S., Nguyen, L.A., Kim, B., Tuzova, M., and Diaz-Griffero, F. (2013a). The retroviral restriction ability of SAMHD1, but not its deoxynucleotide triphosphohydrolase activity, is regulated by phosphorylation. *Cell Host Microbe* 13, 441–451.
- White, T.E., Brandariz-Núñez, A., Valle-Casuso, J.C., Amie, S., Nguyen, L., Kim, B., Brojatsch, J., and Diaz-Griffero, F. (2013b). Contribution of SAM and HD domains to retroviral restriction mediated by human SAMHD1. *Virology* 436, 81–90.
- Wieland, S., Thimme, R., Purcell, R.H., and Chisari, F.V. (2004). Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6669–6674.

- Wieland, S.F., Guidotti, L.G., and Chisari, F.V. (2000). Intrahepatic Induction of Alpha/Beta Interferon Eliminates Viral RNA-Containing Capsids in Hepatitis B Virus Transgenic Mice. *J. Virol.* 74, 4165–4173.
- Xia, Y., Stadler, D., Lucifora, J., Reisinger, F., Webb, D., Hösel, M., Michler, T., Wisskirchen, K., Cheng, X., Zhang, K., et al. (2016). Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α Produced by T Cells Reduce the HBV Persistence Form, cccDNA, Without Cytolysis. *Gastroenterology* 150, 194–205.
- Yan, N., and Chen, Z.J. (2012). Intrinsic Antiviral Immunity. *Nat. Immunol.* 13, 214–222.
- Yan, R., Zhao, X., Cai, D., Liu, Y., Block, T.M., Guo, J.-T., and Guo, H. (2015). The Interferon-Inducible Protein Tetherin Inhibits Hepatitis B Virus Virion Secretion. *J. Virol.* 89, 9200–9212.
- Yano, Y., Azuma, T., and Hayashi, Y. (2015). Variations and mutations in the hepatitis B virus genome and their associations with clinical characteristics. *World J. Hepatol.* 7, 583–592.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., and Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* 5, 730–737.
- Yu, S., Chen, J., Wu, M., Chen, H., Kato, N., and Yuan, Z. (2010). Hepatitis B virus polymerase inhibits RIG-I- and Toll-like receptor 3-mediated beta interferon induction in human hepatocytes through interference with interferon regulatory factor 3 activation and dampening of the interaction between TBK1/IKK ϵ and DDX3. *J. Gen. Virol.* 91, 2080–2090.
- Yu, X., Yu, Y., Liu, B., Luo, K., Kong, W., Mao, P., and Yu, X.-F. (2003). Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* 302, 1056–1060.
- Zhang, Y.-Y., and Hu, K.-Q. (2015). Rethinking the pathogenesis of hepatitis B virus (HBV) infection. *J. Med. Virol.* 87, 1989–1999.
- Zhu, C., Gao, W., Zhao, K., Qin, X., Zhang, Y., Peng, X., Zhang, L., Dong, Y., Zhang, W., Li, P., et al. (2013). Structural insight into dGTP-dependent activation of tetrameric SAMHD1 deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nat. Commun.* 4, 2722.